

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



**ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS
ADULTA EN UN MODELO MURINO
DE SOBREEXPRESIÓN
CONDICIONAL DE LA GLUCÓGENO
SINTASA QUINASA-3 β**

TESIS DOCTORAL

Almudena Fuster Matanzo

Madrid, 2011

Memoria de investigación presentada por
Almudena Fuster Matanzo
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por la **Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por:
Dr. Félix Hernández Pérez
Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular
de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de
Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el laboratorio
dirigido por Jesús Ávila en el Centro de Biología
Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)



ÍNDICE

INDICE	I
ABREVIATURAS	VII
SUMMARY	XIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Neurogénesis adulta	3
1.1 Marco general	3
1.2 Zonas neurogénicas	3
1.3 Hipocampo	4
1.3.1 Diferencias regionales en el hipocampo; estructuras dorsal y ventral	4
1.3.1.1 Generalidades	4
1.3.1.2 Conectividad anatómica de las regiones dorsal y ventral del hipocampo	6
1.4 Zona subgranular del hipocampo (SGZ)	7
1.5 Zona subventricular (SVZ)/ Bulbo olfatorio (BO)	8
1.6 Abordajes para el estudio de la neurogénesis adulta hipocampal	8
1.6.1 Identificación de células precursoras	8
1.6.2 Identificación de células proliferativas	9
1.6.3 Identificación del fenotipo de las células identificadas como nuevas	10
1.7 Ciclo vital de los precursores granulares del giro dentado	12
1.7.1 Nacimiento y diferenciación	12
1.7.1.1 Células tipo 1 (células B)	12
1.7.1.2 Células tipo 2 (células tipo D1)	13
1.7.1.3 Células tipo 3 (células tipo D1/D2)	14
1.7.2 Etapas posteriores de maduración	14
1.8 Funciones de la neurogénesis adulta hipocampal	15
1.9 Regulación de la neurogénesis adulta en el hipocampo	16
1.9.1 Factores que regulan la neurogénesis adulta hipocampal	17
1.10 Neurogénesis adulta en las regiones dorsal y ventral del hipocampo	19
1.11 Neurogénesis adulta y neurodegeneración	20
2. La proteína GSK-3	22
2.1 Regulación de GSK-3	23
2.1.1 Regulación por fosforilación	23
2.1.2 Regulación por formación de complejos proteicos	24
2.1.3 Regulación por localización intracelular	25

2.2	Recambio de GSK-3	25
2.3	Funciones de GSK-3.....	26
2.4	GSK-3 y neurogénesis	27
2.5	GSK-3 y neurodegeneración.....	28
3.	La proteína tau como principal sustrato de GSK-3	30
3.1	Generalidades	30
3.2	Tau y neurogénesis adulta	31
	OBJETIVOS	33
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1.	Materiales	39
1.1	Reactivos	39
1.2	Anticuerpos	39
1.3	Animales	41
1.4	Diseño experimental.....	42
2.	Metodología	44
2.1	Disecciones y tratamiento del tejido	44
2.2	Técnicas bioquímicas	44
2.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
2.2.2	PCR cuantitativa (<i>qRT-PCR</i>).....	45
2.2.3	Preparación de extractos proteicos	47
2.2.4	Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	47
2.2.5	<i>Array</i> de citoquinas	48
2.3	Técnicas histológicas.....	49
2.3.1	Inmunohistoquímica.....	49
2.3.2	Inmunofluorescencia de tejido	49
2.3.3	Cuantificación de células.....	50
2.3.3.1	Estudio del patrón de distribución de las células DCX ⁺ en la capa granular.....	51
2.3.3.2	Análisis de la arborización dendrítica en las células DCX ⁺	51
2.3.4	Medida del volumen del giro dentado	51
2.4	Pruebas de comportamiento	52
2.4.1	Test de alimentación suprimida por novedad.....	52
2.4.2	Test de luz/oscuridad.....	52
2.5	Análisis estadístico	52

RESULTADOS	55
1. Descripción de las alteraciones en neurogénesis adulta en el modelo Tet/GSK-3 y estudio de los efectos sobre la misma del tratamiento con doxiciclina (reversión)	57
1.1 Expresión de GSK-3 β durante el proceso de neurogénesis adulta	58
1.2 Estudio de las alteraciones en la diferenciación/maduración de los precursores neuronales	60
1.2.1 Análisis de la densidad total de células DCX ⁺ ; efectos de la reversión	60
1.2.2 Patrón de localización del marcador DCX	61
1.2.3 Alteraciones en la arborización dendrítica de las células DCX ⁺	62
1.2.4 Estudio del patrón de temporal de expresión del marcador DCX	62
1.2.5 Estudio de las alteraciones en marcadores de madurez; NeuN	66
1.3 Estudio de los precursores neuronales en etapas iniciales de la neurogénesis adulta; análisis de la proliferación	67
1.3.1 Estudio de la proliferación de los precursores neuronales	67
1.3.2 Análisis de los precursores neuronales tempranos; células nestina positivas	68
1.4 Estudio temporal de las alteraciones observadas en los animales Tet/GSK-3 β	70
1.5 Alteraciones en las células microgliales	72
1.5.1 Cuantificación de células microgliales (células Iba-1 positivas)	73
1.5.2 Array de citoquinas	74
1.6 PCR cuantitativa (<i>qRT-PCR</i>)	74
2. Hipocampo dorsal versus ventral; diferencias bioquímicas y celulares	77
2.1 Niveles de GSK-3 β en el giro dentado del hipocampo dorsal <i>versus</i> ventral	77
2.2 Neurodegeneración diferencial en las regiones dorsal y ventral	79
2.3 Análisis de la muerte en el giro dentado dorsal <i>versus</i> ventral	81
2.4 Estudio de la neuroinflamación en las regiones dorsal y ventral hipocampales	81
2.5 Alteraciones en el comportamiento derivadas de la sobreexpresión de GSK-3 β	82
2.6 Neurogénesis adulta en las regiones dorsal y ventral del hipocampo	83
2.6.1 Estudio de las alteraciones en los precursores DCX ⁺ en el hipocampo dorsal <i>versus</i> el hipocampo ventral	84
2.6.2 Proliferación	85
3. Implicación de la proteína tau en la neurogénesis adulta	86

3.1	Análisis de fosforilación de la proteína tau durante la neurogénesis adulta.....	87
3.1.1	Estudios de colocalización entre el anticuerpo PHF-1 y y diferentes marcadores del proceso de neurogénesis adulta	87
3.1.2	Localización subcelular del marcaje con PHF-1	88
3.1.3	Estudio de otros epítomos de fosforilación de la proteína tau.....	89
3.2	Neurogénesis adulta en el ratón Tau ^{-/-} (<i>Knock-out</i> o KO).....	90
DISCUSIÓN.....		93
1.	La sobreexpresión de GSK-3 β provoca alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta	95
2.	Las alteraciones en neurogénesis adulta revierten parcialmente con la administración de doxiciclina	104
3.	La sobreexpresión de GSK-3 β afecta de manera diferencial a las regiones dorsal y ventral del hipocampo.....	107
4.	La proteína tau facilita el proceso de neurogénesis adulta	110
5.	Implicación de los defectos observados en neurogénesis adulta en los procesos neurodegenerativos; enfermedad de Alzheimer	111
CONCLUSIONES.....		117
BIBLIOGRAFÍA.....		121
ANEXO I.....		143
ANEXO II.....		147

ABREVIATURAS

- A β** : péptido β -amiloide
- AD**: *Alzheimer's disease*/ Enfermedad de Alzheimer
- ADN**: Ácido desoxiribonucleico
- APP**: *Amyloid precursor protein*/Proteína precursora del amiloide
- ARN**: Ácido ribonucleico
- ATP**: *Adenosine-5'-triphosphate*/ Adenosina-5'-trifosfato
- BDNF**: *Brain-derived neurotrophic factor*/ Factor de crecimiento neurotrófico derivado de cerebro
- BLBP**: *Brain lipid-binding protein*/ Proteína de unión a lípidos del cerebro
- BMPs**: *Bone morphogenetic proteins*/ Proteínas morfogenéticas del hueso
- BO**: Bulbo olfatorio
- BrdU**: *5-bromo-2'-deoxyuridine*/5-2'- Bromo-deoxiuridina
- β -gal**: *β -galactosidase*/ β -galactosidasa
- BSA**: *Bovine serum albumin*/ Albúmina de suero bovino
- CA**: *Cornu Ammonis*/ Asta de Ammon
- cADN**: ADN complementario
- CamKII α** : *Calcium- calmodulin-dependent kinase type II*/ Calcio-calmodulina quinasa II α
- cAMP**: *Cyclic adenosine monoPhosphate*/ Adenosin monofosfato cíclico
- CB**: *Calbindin*/Calbindina
- CK-I**: *Casein kinase I*/ Caseína quinasa I
- CldU**: *5-chloro-2'-deoxyuridine*/ 5-cloro-2'-deoxuridina
- CR**: *Calretinin*/Calretinina
- CRMP-4**: *Collapsin response mediator protein 4*/ Proteína mediadora de la respuesta a colpasina 4
- C-terminal**: Carboxilo-terminal
- DAB**: *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*/3,3'-Diaminobencidina tetrahidroclorada
- DAPI**: *4',6-Diamidino-2-phenylindole*/ 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCX**: *Doublecortin*/ Doblecortina
- DISC-1**: *Disrupted in schizophrenia 1*
- Doxy**: *Doxycycline*/ Doxiciclina
- Dvl**: *Dishevelled*
- eIF2B**: *Eukaryotic initiation factor 2B*/ Factor de iniciación eucariótico
- FAD**: *Familial Alzheimer's Disease*
- FBS**: *Fetal bovine serum*/ Suero fetal bovino
- FGF-2**: *Fibroblast growth factor-2*/ Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2
- FMRP**: *Fragile X mental retardation 1*
- GABA**: *Gamma-aminobutyric acid*/ Ácido gamma-aminobutírico

GD: Giro dentado

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*/Proteína ácida fibrilar glial

GFP: *Green fluorescent protein*/ Proteína verde fluorescente

GSK-3: *Glucogen synthase kinase 3*/ Glicógeno sintasa quinasa 3

H³: Tritio

HMG: *Homeo box genes*/ Genes homeóticos

HSF-1: *Heat shock factor protein 1*/ Factor de transcripción de choque térmico 1

IdU: *5-iodo-2' deoxyuridine*/ 5-yodo-2'-deoxiuridina

IF: Inmunofluorescencia

IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*/ Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IHQ: Inmunohistoquímica

KDa: KiloDaltons

KO: *Knock-out*

LTD: *Long term depression*/ Depresión a corto plazo

LTP: *Long term potentiation*/ Potenciación a largo plazo

MAP1B: *Microtubule-associated protein 1B*/ Proteína de asociación a microtubules 1B

MAPs: *Microtubule-associated proteins*/ Proteínas de asociación a microtubules

mARNs: ARN mensajero

NeuN: *Neuronal nuclei*

NF- κ B: *Nuclear factor κ B* / Factor nuclear κ B

NGF: *Nerve growth factor*/ Factor de crecimiento nervioso

NMDA: *N-Methyl-D-aspartate*/ N-Metil-D-aspartato

NPCs: *Neural precursor cells*/ Células precursoras neurales

N-terminal: Amino terminal

pb: Pares de bases

PB: *Phosphate buffered*/ Buffer fosfato

PBS: *Phosphate buffered saline*/ Buffer fosfato salino

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*/ Antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: *Polymerase chain reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: *Paraformaldehyde*/Paraformaldehído

PH3: *Phosphohistone H3*/ Fosfohistona H3

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*/ Fosfatidilinositol 3 quinasa

PKB o Akt: *Protein kinase B or Akt*/ Proteína quinasa B o Akt

PKC: *Protein kinase C* /Proteína quinasa C

PP2A: *Protein phosphatase 2A*/ Proteína fosfatasa 2A

Prox-1: *Prospero homeobox protein 1*/ Homólogo del gen *prospero* de *D. melanogaster*

PS1: *Presenilin-1*/Presenilina-1

PS2: *Presenilin-2/ Presenilina-2*

PSA-NCAM: *Poly-sialated neural cell adhesion molecule/* Forma poli-sializada de la molécula neuronal de adhesión

RMS: *Rostral migratory stream/*Corriente migratoria rostral

SGZ: *Subgranular zone/* Zona Subgranular

shARN: *Small harpin* ARN

Shh: *Sonic Hedgehog*

SNC: Sistema nervioso central

Sox-2: *Sex determining region Y-box 2/*Region determinante del sexo Y-2

SVZ: *Subventricular zone/* Zona subventricular

TNF- α : *Tumoral necrosis factor α /* Factor de necrosis tumoral α

VEGF: *Vascular endothelial growth factor/* Factor de crecimiento vascular endotelial

WB: *Western blot*

Wt: *Wild type/* Silvestre

X-Gal:*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside/*5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido

SUMMARY

Adult neurogenesis in dentate gyrus (DG), a process of generating functional neurons from adult neural precursors, has been related to memory and learning processes. On the other hand, glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has been also related to memory and more recently to adult neurogenesis. Here, using a conditional transgenic model overexpressing GSK-3 β (Tet/GSK-3 β model), we have demonstrate that DG atrophy observed in this animal model could be due in part to alterations in adult neurogenesis. These alterations mainly affect differentiation/maturation process, causing a delay in time pattern expression of doublecortin (DCX) marker, alterations in time pattern expression of NeuN marker and changes in dendritic morphology of DCX-positive cells. We have also observed a decrease in nestin positive cells, considered as neuronal precursor cells and an increase in active microglia cells as well as changes in levels of some cytokine molecules like eotaxin, fractalkine, GM-CSF and IFN- γ . All these findings suggest that cellular environment would become detrimental contributing to the impairment of adult neurogenesis process observed in GSK-3 β overexpressing mice. Here, we also show that shutdown of GSK-3 β overexpression after doxycycline treatment leads to normal microglia and normal DCX-positive cells density, although depletion of precursor cells is a non reversible phenomenon.

In another part of this work, we have tested if dorsal and ventral hippocampal regions respond in a different manner to increased GSK3 β levels. We have found reactive astrocytosis, increased neuronal death and a significant reduction in granular cell layer volume and total cell number in dorsal region but not in the ventral one. Biochemistry analysis have shown higher levels of phosphorylated GSK3 β in serine-9 that inactivate the enzyme in ventral region compared to dorsal area suggesting that the observed susceptibility is in part due to different GSK3 regulation. Previous studies have demonstrated impairment in Morris Water Maze and Object recognition tests pointing out to dorsal hippocampal atrophy. Here, we have observed that there are no changes in two tests used to evaluate emotional status, the light–dark box and the novelty suppressed feeding test, suggesting that GSK3 β mice do not show any anxiety-related disorder. Thus, our results demonstrate that *in vivo* overexpression of GSK3 β results in dorsal but not ventral hippocampal DG neurodegeneration and suggest that both areas do not behave in a similar manner in neurodegenerative processes.

Finally, we here investigated whether tau protein, a main substrate of GSK-3, plays a role in adult neurogenesis. First we demonstrate that new neurons generated in the subgranular zone (SGZ) express tau in a hyperphosphorylated form. Phospho-tau expression colocalized with DCX but not with GFAP, Ki67 or calbindin. The same was observed in the subventricular zone (SVZ). Tau *knockout* mice did not show a significant decrease in the number of DCX-positive cells, although an alteration of pattern localization of the marker was observed. These findings suggest that basal tau phosphorylation present in adult animals is in part due to neurogenesis and from Tau *knockout* mice it seems that tau could be involved in normal migration of new neurons.

INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis adulta

1.1 Marco general

El término neurogénesis adulta hace referencia a la formación de nuevas neuronas en el cerebro en una etapa post-natal. Este proceso fue descubierto relativamente tarde en el siglo XX. La primera demostración de su existencia se debe a Joseph Altman en 1962 (Altman, 1962), pero fue a principios de los años 90 cuando la neurogénesis adulta y su estudio ganaron interés científico.

Cronológicamente, la última demostración definitiva de la existencia de la neurogénesis adulta debe atribuirse a Elizabeth Gould, Heather Cameron y colaboradores, en conjunción con el laboratorio del Profesor Bruce McEwen en el año 1992, año en el que se publicaron varios estudios que combinaban los métodos autorradiográficos clásicos del momento con los métodos inmunohistoquímicos que comenzaron a aplicarse extensivamente a partir de ese momento (Cameron *et al.*, 1993).

La neurogénesis adulta es un proceso que se ha observado en numerosas especies de distinta escala filogenética. Como norma general puede decirse que en los organismos con sistemas nerviosos más primarios se observa una tendencia mayor a la permanencia de la neurogénesis a lo largo de toda la vida que en organismos que poseen sistemas nerviosos más complejos.

En mamíferos no primates se ha descrito neurogénesis en ratones, rata, cobaya, perrillo de las praderas y conejo. Y en primates se sabe que existe neurogénesis adulta desde el año 1981 (Rakic y Nowakowski, 1981; Rakic, 1985). En humanos se atribuye el descubrimiento de la existencia de neurogénesis adulta a Ericsson y colaboradores en el año 1998. Estudios posteriores *ex vivo* han podido corroborar que el cerebro humano contiene células madre en la edad adulta capaces de dar lugar a neuronas (Kirschenbaum *et al.*, 1994) y de originar neuroesferas primarias y secundarias *in vitro* (Kukekov *et al.*, 1999). En el año 2002, Song y colaboradores demostraron que precursores aislados de hipocampo humano de adulto, al ser cultivados conjuntamente con astrocitos y neuronas hipocámpales extraídas de neonatos, eran capaces de presentar características típicas de neuronas y astrocitos diferenciados, integrarse en circuitos preexistentes y ser sináptica y eléctricamente funcionales (Song *et al.*, 2002).

1.2 Zonas neurogénicas

Las zonas neurogénicas del cerebro se caracterizan por la presencia de una matriz germinativa con una producción significativa de nuevas neuronas a lo largo de toda la vida. En el cerebro adulto de mamíferos, estas zonas parecen reducirse en condiciones fisiológicas a la zona subventricular (SVZ), bulbo olfatorio (BO), y al giro dentado (GD) del hipocampo. Las zonas neurogénicas se definen, no tanto por la presencia de precursores neurogénicos en sí,

sino por la presencia de una matriz germinativa de características especiales que mantiene una producción significativa de nuevas neuronas a lo largo de toda la vida.

A este respecto, es importante resaltar el concepto de “permisividad neurogénica” (revisado por Kempermann, 2006). Para que una zona pueda considerarse como verdaderamente neurogénica debe cumplirse el hecho de que cuando una célula precursora se trasplanta a ella debe dar lugar a una neurona, mientras que si esa misma célula precursora fuese trasplantada a una zona no neurogénica, debería originar una célula glial o morir. Dicha permisividad se consigue gracias a la presencia de un micro-ambiente especial consistente en cierto tipo de interacciones célula-célula y de factores difusibles, que promueven el desarrollo neuronal de precursores intrínsecos y cuyo potencial puede comprobarse con la implantación de precursores externos. En estos microambientes, las células se encuentran organizadas formando una unidad funcional que engloba a los precursores propiamente dichos, astrocitos, células endoteliales, microglía, macrófagos, matriz extracelular especial y contactos con la membrana basal. Esta particular estructura es exclusiva de las zonas neurogénicas del cerebro (Kempermann, 2006).

1.3 Hipocampo

El hipocampo es una estructura bilateral que se encuentra en los lóbulos temporales de ambos hemisferios cerebrales. Su nombre deriva del término latino *hippocampus*, que significa caballito de mar, y recibe este nombre por sus similitudes morfológicas con el cuerpo de dicho animal. El hipocampo pertenece a la parte evolutivamente más antigua de la corteza cerebral, el denominado *allocortex*. Su estructura se divide en tres capas: la más interna de ellas se denomina plexiforme interna y se encuentra en contacto directo con la siguiente capa de neuronas, que a su vez se sitúa junto a la capa superficial formada por fibras. Anatómicamente el hipocampo puede subdividirse en las siguientes regiones: *fascia dentata* o giro dentado, *cornu ammonis* o asta de Ammon (que se subdivide a su vez en las regiones CA1, CA2 y CA3), presubiculo y subículo (**Fig. 1 C**).

1.3.1 Diferencias regionales en el hipocampo; estructuras dorsal y ventral

1.3.1.1 Generalidades

Son muchas las evidencias que demuestran que el hipocampo no debe ser considerado como una estructura única, sino como un conjunto de estructuras que comprenden una región rostral/dorsal y una caudal/ventral (equivalentes a las zonas posterior y anterior en primates respectivamente) cada una responsable de funciones muy diferentes y separadas por una región intermedia que comparte características solapantes con sus “vecinas” adyacentes y que las separa anatómicamente (**Fig. 1**). En 1998, Moser y Moser ya propusieron la idea de que el

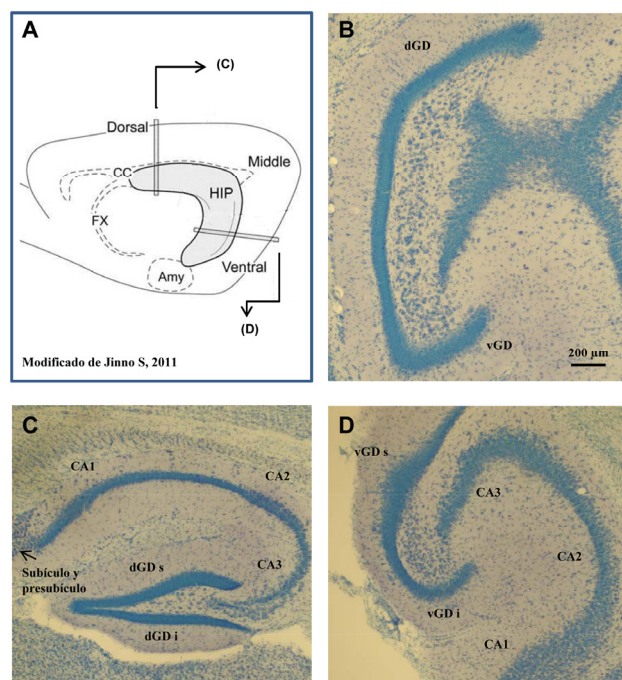


Figura 1. A. Esquema representativo del cerebro de ratón adulto y la división del hipocampo (HIP) en tres regiones: dorsal, medial y ventral. Las flechas indican las imágenes que representan cada región por separado [Abreviaturas: cuerpo calloso (CC), fornix (FX), amígdala (Amy)]. Tinción de Nissl en secciones sagitales del cerebro adulto de ratón que muestra las regiones dorsal y ventral hipocámpales aún unidas como una estructura anatómica única [lateral 2,64 mm en el atlas de Paxinos. (Paxinos G y Franklin B. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* Elsevier Science, USA)] (**B**) o como regiones independientes; dorsal (**C**) y ventral (**D**) [lateral 2,16 mm en el atlas de Paxinos. (Paxinos G y Franklin B. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* Elsevier Science, USA)]. Se indican las distintas subregiones hipocámpales: cuerpo de *ammon* (CA1, CA2, CA3), presubiculo, subiculo y GD. (dGDs= giro dentado dorsal, capa suprapiramidal; dGD i= giro dentado dorsal, capa infrapiramidal; vGDs= giro dentado ventral, capa suprapiramidal; vGD i= giro dentado ventral, capa infrapiramidal).

hipocampo no es una estructura unitaria (Moser y Moser, 1998). Este argumento estaba basado en tres bloques de datos. En primer lugar, diversos estudios indicaban que las aferencias y las eferencias del hipocampo dorsal y ventral son distintas (Swanson, 1977). Por otro lado, la memoria espacial parecía depender del hipocampo dorsal y no del ventral (Moser *et al.*, 1995). Finalmente, las lesiones producidas en la zona ventral y no en la dorsal, alteraban las respuestas a estrés y el comportamiento emocional (Henke, 1990). Datos posteriores fueron confirmando estas primeras observaciones. Así, son numerosas las evidencias derivadas de los resultados obtenidos en pruebas de comportamiento llevadas a cabo en ratones. Un test muy informativo utilizado para medir la memoria espacial en roedores es el test de Morris Water Maze, en el que los animales deben nadar en una piscina hasta encontrar una plataforma escondida guiándose por marcas situadas fuera de la misma (Morris, 1981). Esta tarea implica claramente a la región dorsal

hipocámpal. Lesiones que tan sólo se restringen a un 25% de esta zona se han visto empeoran los resultados obtenidos en el test. Asimismo, lesiones adicionales provocadas en la zona ventral no exacerban dichos déficits (Moser *et al.*, 1995). En el mismo sentido, aunque menos esclarecedores en cuanto a lo que se refiere a la zona ventral, han sido los datos obtenidos en la prueba de miedo condicionado, en la que se obtiene información sobre memoria espacial (miedo contextual) y no espacial (miedo asociado a pistas visuales o espaciales u olfativas en

el que la ejecución del test está motivada por las emociones). En este caso, de nuevo lesiones en el área dorsal del hipocampo se ha observado que producen déficits en la retención de la memoria contextual no así en el caso de la memoria “emocional” (Kim y Fanselow, 1992). Por su parte, lesiones en el hipocampo ventral o infusiones de muscimol (que inactiva a las neuronas de forma temporal), se ha visto que bloquean el miedo asociado a un sonido provocando un efecto menos consistente en la memoria contextual (Maren y Holt, 2004; Rogers y Kesner, 2006; Hunsaker y Kesner, 2008). Parece claro que en todos los procesos de memoria relacionados con emociones como el miedo, juega un papel importante la amígdala, que sólo recibe aferencias procedentes del hipocampo ventral (Maren y Fanselow, 1995).

Sumados a estos datos, recientemente y, gracias a estudios basados en análisis sistemáticos y de alta resolución de la librería digital de expresión génica “The Allen Brain Atlas” (ABA, www.brain-map.org), se sabe que las neuronas piramidales de CA1 y CA3 presentan claras diferencias regionales (eje dorso-ventral) y laminares (eje transversal que lo divide en las capas infra y suprapiramidal) a nivel molecular, lo cual refuerza la idea de que el hipocampo no debe ser considerado como una estructura única y homogénea.

1.3.1.2 Conectividad anatómica de las regiones dorsal y ventral del hipocampo

La conectividad neuronal del hipocampo ha sido extensamente estudiada en las últimas tres décadas en ratas, gatos y monos (Swanson, 1987; Burwell, 2000; Witter, 2004).

El GD y los campos CA forman el circuito trisináptico de procesamiento de la información. La primera de las sinapsis tiene lugar entre las fibras aferentes de las capas superiores de la corteza entorrinal que contactan con las dendritas de las neuronas granulares del GD. Los axones de las neuronas granulares constituyen después el tracto de fibras musgosas y se dirigen a contactar con las neuronas piramidales de CA3 finalizando en unas estructuras particulares conocidas con el nombre de botones musgosos, originando así la segunda sinapsis del circuito. Posteriormente, las neuronas de CA3 envían las llamadas colaterales de Schaffer a contactar con CA1, dando lugar a la tercera sinapsis del circuito. Adicionalmente, las neuronas de CA1 envían proyecciones excitatorias a las partes dorsales del subículo, el presubículo y el postsubículo (Swanson, 1977; van Groen y Wyss, 1990; Witter y Groenewegen, 1990; Amaral *et al.*, 1991; Witter, 2004).

Las diferencias entre el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral son muy claras en cuanto a lo que a conectividad se refiere. En primer lugar, las aferencias recibidas por las dendritas de las neuronas granulares procedentes de la corteza entorrinal ya siguen un patrón establecido. Así, las zonas caudolaterales de la corteza, que son aquellas que reciben mayoritariamente la información visual y espacial, proyectan específicamente sobre la región dorsal/septal del hipocampo, mientras que las regiones rostromediales, encargadas de recibir información olfativa, visceral y gustativa, inervan el hipocampo ventral/temporal. En segundo

lugar, las neuronas de CA1 envían proyecciones directamente al bulbo olfatorio así como a otras áreas corticales olfatorias en ratas (Cenquizca y Swanson, 2007) y monos (Roberts *et al.*, 2007) únicamente en el caso del hipocampo ventral. Además, sólo las regiones ventrales y no dorsales de CA1 y del subículo comparten conexiones masivas bidireccionales con el núcleo amigdalario que recibe aferencias sensitivas olfatorias principales y accesorias (Saunders *et al.*, 1988; Kishi *et al.*, 2000b; Pitkanen *et al.*, 2000; Petrovich *et al.*, 2001; Witter, 2004; Cenquizca y Swanson, 2007). Por último, el hipocampo ventral en conjunto con el subículo y el núcleo amigdalario inervan las regiones periventriculares y mediales del hipotálamo, la principal estructura implicada en el control de las actividades neuroendocrinas, autónomas y somáticas relacionadas con tres comportamientos básicos de fuerte componente emocional como son la ingestión (beber y comer), la reproducción (sexual y parental) y la defensa (Kishi *et al.*, 2000b; Dong *et al.*, 2001; Petrovich *et al.*, 2001; Herman *et al.*, 2005; Dong, 2006).

En conclusión, todas las diferencias anatómicas y moleculares apoyan la diferente funcionalidad de las regiones dorsal/septal y ventral/temporal del hipocampo, aunque es importante tener en cuenta también que las tres regiones del hipocampo (incluida la intermedia) tampoco se encuentran completamente aisladas entre sí, pudiendo interactuar a través de diversas rutas.

1.4 Zona subgranular del hipocampo (SGZ)

In vivo, los precursores de GD residen en una estrecha banda de tejido llamada zona subgranular (SGZ), que morfológicamente puede definirse de forma aproximada como una capa de unos tres núcleos de profundidad (20 – 25 μm de grosor), incluyendo la banda celular basal de la capa granular, y una zona de dos núcleos de profundidad hacia el hilus (Kempermann, 2006). Se trata de una zona altamente vascularizada (Palmer *et al.*, 2000) e inervada por diversos sistemas de neurotransmisión provenientes de casi la totalidad de regiones del cerebro. Se cree que las complejas interacciones que tienen lugar entre los elementos vasculares y las células precursoras son cruciales para el proceso neurogénico (Jin *et al.*, 2002).

Tanto en la SVZ como en la SGZ, las células progenitoras a partir de las cuales se produce la proliferación son un conjunto de astrocitos (Doetsch y Hen, 2005). Siguiendo la nomenclatura inicial propuesta por Seri y colaboradores en 2001 (Seri *et al.*, 2001), en el hipocampo, estos astrocitos (células tipo B) se dividen para dar lugar a precursores intermedios o células tipo D. Células B y células D se organizan de forma característica en lo que se conocen como nichos neurogénicos, en los cuales, los precursores intermedios se encuentran formando grupos o *clusters* de entre dos y cuatro células, a su vez rodeados por los astrocitos. Las células tipo D generan de forma progresiva una progenie más diferenciada que finalmente, madura para convertirse en neuronas granulares (Seri *et al.*, 2004). Estas nuevas neuronas

comienzan a extender sus dendritas hacia la capa granular y envían sus axones a la región CA3 hipocampal. Aproximadamente a partir de dos semanas después de su formación, estas neuronas comienzan a recibir fundamentalmente señalización glutamatérgica de las vías aferentes procedentes de la corteza entorrinal. Este hecho, asimismo, coincide con la aparición de espinas dendríticas en las nuevas neuronas (Zhao *et al.*, 2006). Entre cuatro y seis semanas después de su formación, las neuronas se encuentran ya totalmente integradas en el circuito en roedores (Jones *et al.*, 2003). En macacos este proceso parece durar unos 6 meses (Kohler *et al.*, 2011).

1.5 Zona Subventricular (SVZ)/ Bulbo olfatorio (BO)

El sistema olfatorio contiene dos regiones neurogénicas. Una de ellas supone la renovación de las neuronas receptoras olfatorias, que tiene lugar en el epitelio olfativo, fuera del sistema nervioso central (SNC). La otra reside en las paredes de los ventrículos cerebrales y da lugar a distintos tipos de interneuronas; es la región conocida como zona subventricular (SVZ), de uno ó dos núcleos de espesor hacia el interior del epéndimo. Desde la SVZ las células migran una larga distancia hasta alcanzar el bulbo a través de lo que se conoce como corriente migratoria rostral (RMS). Al igual que en la SGZ, los progenitores neurales son un conjunto de astrocitos (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001) que dan lugar a los precursores que inician la migración. Durante ella, algunos tipos celulares continúan proliferando, aunque lo hacen en menor medida, a la vez que progresan en su diferenciación (Menezes *et al.*, 1995). Una gran cantidad de las neuronas que llegan al bulbo muere, por lo que se requiere un aporte continuo y elevado de células a dicha estructura (Biebl *et al.*, 2000).

1.6 Abordajes para el estudio de la neurogénesis adulta hipocampal

1.6.1 Identificación de células precursoras

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado, los marcadores encontrados para identificar esta población celular resultan bastante ambiguos. Lo más empleados son:

- **GFAP:** Se trata de la proteína ácida fibrilar glial ampliamente conocida por ser un marcador de astrocitos maduros en el cerebro. El uso de modelos transgénicos demostró que los precursores GFAP⁺ constituyen la principal fuente de neurogénesis del cerebro frontal de ratones (García *et al.*, 2004); la ablación dirigida de células proliferativas que expresan GFAP suprime la generación de neuroblastos y la formación de nuevas neuronas en el GD. El uso de GFAP en el estudio de la neurogénesis adulta es limitado debido a que tiñe tanto el linaje neuronal como los astrocitos maduros.

- **Nestina:** En 1992, Reynolds y Weiss demostraron por primera vez la expresión del filamento intermedio específico de neuronas, nestina, en células proliferantes del cerebro

adulto de ratón (Reynolds y Weiss, 1992). Posteriormente, el uso de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo ciertas regiones reguladoras del gen de la nestina ha corroborado esto (Yamaguchi *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2006). A diferencia del marcador GFAP, el anticuerpo anti-nestina tiñe aquellas células que son susceptibles de sufrir únicamente neurogénesis y no gliogénesis (Cao *et al.*, 2006).

- **BLBP**: Es un miembro de la familia de proteínas de unión a ácidos grasos (Feng *et al.*, 1994; Kurtz *et al.*, 1994) que es expresado en los progenitores neuronales en el cerebro adulto, aunque en las zonas neurogénicas de mamíferos parece ser que no todas las células radiales lo expresan (Sundholm-Peters *et al.*, 2004).

- **Sox-2**: Región determinante del sexo “Sry-related HMG box” (Gubbay *et al.*, 1990). Es un factor de transcripción miembro de la extensa familia de proteínas Sox (Kiefer, 2007) que controla la expresión de distintos genes del desarrollo por lo que es crucial durante el desarrollo embrionario (Bani-Yaghoub *et al.*, 2006). En muchas especies, Sox-2 es un marcador del sistema nervioso desde el inicio del desarrollo (Uwanogho *et al.*, 1995; Wood y Episkopou, 1999; Kamachi *et al.*, 2000; Kishi *et al.*, 2000a; Avilion *et al.*, 2003) y su expresión se mantiene en los progenitores neuronales durante la neurogénesis (Ferri *et al.*, 2004; Bani-Yaghoub *et al.*, 2006).

1.6.2 Identificación de las células proliferativas

Históricamente los primeros marcadores usados con este fin fueron la timidina marcada con tritio (H^3) y la 5'-2'-bromo-deoxiuridina (BrdU). Ambos marcadores tienen un carácter permanente. El fundamento de esta técnica se basa en la incorporación de los nucleótidos marcados al ADN de las nuevas células durante la fase S del ciclo celular (Kempermann, 2006).

Cronológicamente, el uso de timidina tritiada es anterior al de BrdU. Se considera que la resolución es mayor en el caso de la BrdU. De hecho, en las últimas décadas, prácticamente la totalidad de los trabajos acerca de neurogénesis hipocampal adulta han empleado BrdU como marcador permanente.

El marcaje con BrdU es complementado y contrastado en la actualidad con el empleo de otros métodos, entre los que cabe destacar:

- El marcaje con retrovirus que se incorporan selectivamente a las células proliferantes y que pueden ser detectados posteriormente por la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) y registrados electrofisiológicamente (Carlen *et al.*, 2002).
- Marcadores intrínsecos de la proliferación como son:
 - **Antígeno celular de proliferación nuclear (PCNA)**, aunque su uso es problemático y desaconsejado por diversos autores (Kempermann, 2006).
 - **Ki67**: Este antígeno de función desconocida hasta la fecha es un candidato a ser un imprescindible regulador del ciclo celular (Starborg *et al.*, 1996). Ki67

identifica a las células en fase G1 tardía, G2 y M (Scholzen, 2000). Sin embargo, los datos no suelen coincidir con los de BrdU, obteniéndose, en algunas ocasiones, un mayor número de células marcadas (Kee *et al.*, 2002) y en otras un número menor de estas (McKeever *et al.*, 1997).

- **Histona 3 fosforilada (PH3):** La transcripción celular es un proceso altamente regulado. La fosforilación en serina 10 en la histona 3 ha sido implicada tanto en mitosis como en activación transcripcional. Este antígeno es detectado únicamente durante la fase M, por lo que el marcaje celular es muy reducido (Bilang-Bleuel *et al.*, 2005).

1.6.3 Identificación del fenotipo de las células identificadas como nuevas

Los marcadores más frecuentemente utilizados para el estudio del fenotipo de las células generadas en el adulto son, entre otros:

- **NeuN:** La expresión de este marcador se restringe a células postmitóticas, aunque hay algunas poblaciones neuronales especiales fuera de las regiones neurogénicas que no lo expresan. Conocido también como Fox-3, recientemente ha sido identificado como miembro de la familia de factores de *splicing* Fox-1 (Kim *et al.*, 2009a).

- **β-III-Tubulina:** Es un isotipo de la proteína tubulina, uno de los mayores componentes del citoesqueleto celular. La β-III-Tubulina es denominada indistintamente Tuj1. *In vivo* se expresa tempranamente en neuronas inmaduras, paralelamente a NeuroD (Uittenbogaard y Chiaramello, 2002), pero se sabe poco acerca de su re-expresión en neuronas maduras, y por tanto, su uso *in vivo* es a veces insatisfactorio. Sin embargo, es uno de los marcadores más ampliamente usados *in vitro*.

- **TUC-4:** A veces denominado TOAD64, se expresa en neuronas postmitóticas inmaduras que se encuentran en los estadios iniciales de diferenciación y ha sido asociado con procesos de crecimiento axonal. Su expresión única en las partes más distales del cono axonal (Minturn *et al.*, 1995) dificulta la colocalización con otros marcadores. Se desconoce cuando finaliza su periodo de expresión.

- **PSA-NCAM:** Es la forma poli-sializada de la molécula neuronal de adhesión NCAM y es específica del linaje neuronal (Tomasiewicz *et al.*, 1993), al menos dentro de las áreas neurogénicas y siempre tratándose de condiciones fisiológicas. En estas zonas, PSA-NCAM marca células en migración, correspondiendo su expresión en la SGZ a las tipologías celulares 2b y 3 según la nomenclatura adoptada por Kempermann (que será comentada en profundidad más adelante). La expresión de PSA-NCAM es ligeramente posterior a la de NeuroD (Seki, 2002). El ácido polisialílico reduce la adhesión a través de NCAM (Sadoul *et al.*, 1983) y por ello PSA-NCAM se asocia con procesos de migración celular. Puesto que su expresión ocurre en la superficie celular, los estudios de colocalización son complicados.

- **Doblecortina (DCX)**: Es una proteína asociada a microtúbulos abundante en neuroblastos en migración (Meyer *et al.*, 2002), particularmente en los procesos que sirven de guía para el crecimiento axonal y en los conos de crecimiento de neuritas (Friocourt *et al.*, 2003). DCX fue descubierta ya que su mutación causa problemas en la laminación cortical en humanos (Gleeson *et al.*, 1998). En ratones, el silenciamiento de este gen con ARN de interferencia ha producido un fenotipo idéntico al hallado en humanos (Bai *et al.*, 2003). La función de DCX es estrictamente regulada por el balance de la actividad de diversas quinasas y fosfatasas (Schaar *et al.*, 2004) entre las que recientemente se ha identificado a la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β) (Gdalyahu *et al.*, 2004; Bilimoria *et al.*, 2010). Se ha sugerido que varias rutas de señalización convergen en la regulación de DCX, modulándose así la estabilidad de microtúbulos y el comportamiento migrador de los neuroblastos (LoTurco, 2004). En las zonas neurogénicas del adulto, DCX permite la identificación de células 2b y 3 según la nomenclatura descrita por Kempermann (comentada más adelante) en la SGZ. Su expresión es transitoria y coincide con las fases de migración y de extensión de dendritas (Brandt *et al.*, 2003). DCX se expresa incluso en estadios iniciales proliferativos y se mantiene hasta llegar a solapar en el tiempo con la expresión de calretinina (CR) (Brandt *et al.*, 2003). Es considerada un marcador robusto de neurogénesis, ya que su localización peri-nuclear y citoplásmica lo convierten en muy conveniente para los estudios combinados de doble marcaje con otros antígenos, permitiendo, además, la observación de la morfología dendrítica completa (Kempermann, 2006). Dentro y fuera de las áreas neurogénicas, la expresión de DCX coincide con la de PSA-NCAM (Nacher *et al.*, 2001).

- **NeuroD**: En la actualidad no se tienen demasiados datos acerca de los reguladores *upstream* de DCX, pero se sabe que esta molécula contiene un motivo de unión a NeuroD que se expresa en algunas células tipo 2a según la nomenclatura de Kempermann. La expresión de NeuroD precede a la de PSA-NCAM durante la neurogénesis adulta hipocampal (Seki, 2002).

- **Prox1**: *prox1* es el gen homólogo del gen homeobox *prospero* de *D. melanogaster* y su expresión identifica inequívocamente a las neuronas granulares. En GD comienza a expresarse en el estadio 2b y permanece hasta la madurez total de las células (Kronenberg *et al.*, 2003). Junto con NeuN es el único marcador cuya expresión se mantiene incluso en las etapas en que la neurona es completamente madura.

- **Calretinina (CR)**: Es conocida como marcador de células no piramidales GABAérgicas dentro del hipocampo adulto. Pueden encontrarse células calretinina positivas en todas las capas de todas las subregiones hipocámpales incluyéndose CA1, CA3 y GD (Jacobowitz y Winsky, 1991). La expresión transitoria de calretinina se sabe que también ocurre durante la neurogénesis adulta en el GD murino. En las fases más avanzadas del proceso, las nuevas neuronas expresan calretinina y DCX o NeuN pero no producen GABA. En los estadios finales, la expresión de calretinina cesa y las células comienzan a expresar

calbindina, un marcador de neuronas granulares maduras del GD (Brandt *et al.*, 2003). Por tanto, la expresión de este marcador parece estar restringida a una etapa postmitótica reducida en la cual parece tener lugar las conexiones axonales y dendríticas con sus correspondientes dianas (Kempermann *et al.*, 2004b; Ming y Song, 2005).

- **Calbindina (CB)**: El ARN mensajero de calbindina posee una alta expresión en las células de Purkinje del cerebelo y las células granulares del GD (Sequier *et al.*, 1988). Es usada como marcador de neuronas granulares maduras del GD (Rami *et al.*, 1987; Eriksson *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 2003) ya que colocaliza con otros marcadores como NeuN (Scharfman *et al.*, 2005) pero no con PSA-NCAM (Dominguez *et al.*, 2003) o con CR, el marcador de neuronas postmitóticas inmaduras (Nacher *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2003).

1.7 Ciclo vital de los precursores granulares del giro dentado

Desde su nacimiento en la SGZ hasta la finalización del proceso diferenciativo, la progenie del precursor granular avanza a través de una serie de etapas secuenciales que han permitido establecer una nomenclatura de consenso que hace referencia a distintos estadios funcionales. La primera terminología fue propuesta por Seri y colaboradores en 2001, en la que los precursores de la SGZ de tipo glía radial se denominaron células tipo B (Seri *et al.*, 2001). Posteriormente, los mismos autores abandonaron dicha nomenclatura (Seri *et al.*, 2004). Hoy en día es frecuente encontrar en muchos de los estudios sobre neurogénesis adulta hipocampal la terminología propuesta por Kempermann (revisado por Kempermann, 2006).

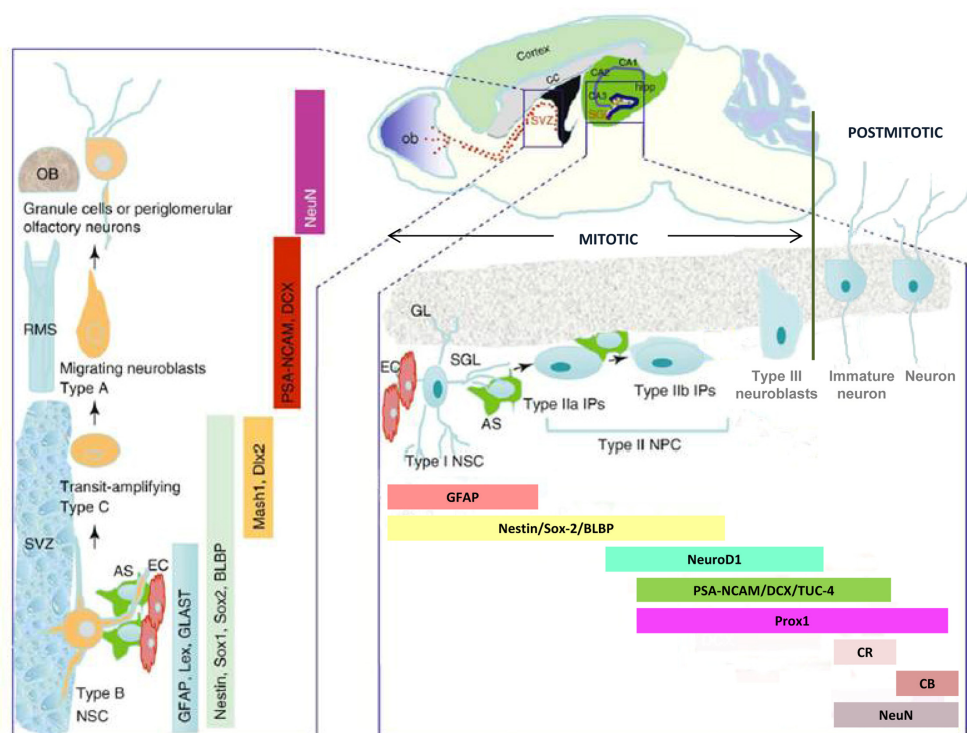
De manera breve, en esta es posible distinguir los siguientes estadios secuenciales (Fig.2):

1.7.1 Nacimiento y diferenciación

1.7.1.1. Células tipo 1 (células B)

Al igual que en la SVZ, los precursores de la SGZ presentan en las etapas iniciales de su desarrollo morfologías características que recuerdan a las de la glía radial presente en el desarrollo prenatal, con una prominente prolongación apical y diversas terminaciones basales fuertemente asociadas a los vasos sanguíneos. Dichos precursores poseen, de hecho, propiedades electrofisiológicas típicas de astrocitos, como son las propiedades pasivas de membrana y las corrientes de potasio (Seri *et al.*, 2001; Filippov *et al.*, 2003). El soma de estos precursores es de forma triangular y las principales características histológicas son la expresión de nestina, GFAP, BLBP, Sox-2 y la ausencia de expresión de S100 β . En condiciones fisiológicas son una subpoblación no muy activa proliferativamente hablando (Huttmann *et al.*, 2003). Pueden, no obstante, sufrir divisiones asimétricas, un fenómeno típico de las células

madre o troncales durante el desarrollo. Las células hijas de estas células tipo 1 conservan la expresión de nestina, BLBP y Sox-2 y constituyen la subpoblación de células denominadas tipo 2 (Filippov *et al.*, 2003).



Modificado de Lazarov *et al.* 2010

Figura 2. Neurogénesis en el ratón adulto. Sección sagital del cerebro adulto mostrando las dos regiones neurogénicas principales : la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD). Las distintas etapas que atraviesan los precursores neuronales se caracterizan por la expresión de diferentes marcadores que se representan en los recuadros coloreados. En los nichos, los precursores (tipo I o células B según la región neurogénica) se encuentran “acompañados” por astrocitos (AS) y células endoteliales (EC) que proporcionan las señales necesarias para el mantenimiento y movilización de los progenitores (Lazarov *et al.*, 2010). [Abreviaturas: cuerpo calloso (CC), hipocampo (hipp), bulbo olfatorio (OB), capa granular (GL), progenitores neuronales (NSCs), progenitores intermedios (IPs), cadena migratoria rostral (RMS)].

1.7.1.2. Células tipo 2 (células tipo D1)

Las células tipo 2 expresan nestina y son en algún grado Sox-2 y BLBP positivas. Tienen procesos cortos que discurren relativamente paralelos a la SGZ. No expresan GFAP y son altamente proliferativas. La forma de los núcleos es irregular, con gránulos de cromatina intensamente condensada. La división celular que llevan a cabo estas células amplificativas tiene lugar en grupos de células o *clusters*, que se acumulan en las proximidades de los vasos sanguíneos e incluyen elementos de glía radial. Las células tipo 2 se dividen a su vez en células tipo 2a y células tipo 2b (células D1) en función de la expresión de la proteína de unión al citoesqueleto DCX, que sólo tiene lugar en las células tipo 2b (Kronenberg *et al.*, 2003). El estadio 2 comprende la transición entre los elementos de tipo glía radial hacia su transformación en un neuroblasto en vías de diferenciación, ya que en las células de tipo 2b

empiezan a resultar evidentes los primeros rasgos de pertenencia al linaje neuronal (Kempermann, 2006).

1.7.1.3. Células tipo 3 (células tipo D1/D2)

Estas células expresan DCX, pero no nestina. Aunque poseen la capacidad de dividirse son muy pocas las que lo hacen, ya que se cree que es durante esta etapa cuando tienen lugar los más importantes cambios morfológicos encaminados al proceso diferenciativo. En esta etapa continúan apareciendo las prolongaciones horizontales características del estadio 2, pero de mayor longitud, a la vez que se originan los primeros procesos verticales y es posible encontrar células con sus prolongaciones orientadas en todas las direcciones intermedias. La morfología del núcleo es en este caso redondeada y son características identificativas de este estadio la expresión de PSA-NCAM y Prox1. Durante esta etapa se produce la migración radial dentro de la capa granular (GL), aunque éste es un fenómeno muy limitado en el caso del GD, ya que la mayoría de las células permanecen en la SGZ o en el tercio interno de la GL y sólo algunas de ellas alcanzan las porciones más exteriores (Kempermann *et al.*, 2003; Kempermann, 2006). Respecto a sus propiedades electrofisiológicas, éste es un estadio bastante heterogéneo, ya que pueden encontrarse células con propiedades similares a los astrocitos tipo 1, así como otras células que muestran los primeros signos de propiedades propiamente típicas de neuronas. Es en esta etapa en la que las células inmaduras reciben las primeras aferencias GABAérgicas o glutamatérgicas. Este estadio supone, por tanto, la transición desde un estado potencialmente proliferativo al de una neurona inmadura postmitótica.

1.7.2 Etapas posteriores de maduración

Las células tipo 3 (y probablemente también algunas que se encuentren en el estadio 2b) salen de ciclo y continúan su diferenciación postmitótica propia de las células granulares. Este estadio de diferenciación al que nos referimos se caracteriza por la expresión transitoria de calretinina, que cambia posteriormente a la de calbindina permaneciendo esta durante los estadios adultos (Brandt *et al.*, 2003). Este cambio de una proteína de unión a calcio por la otra ocurre relativamente pronto y tiene lugar aproximadamente dos o tres semanas después de la salida de ciclo. Solapando con el periodo de expresión de calretinina también son expresados Prox1 y NeuN. En esta fase, las células adquieren la clásica morfología con orientación vertical de las células de tipo 3 tardías. Durante esta etapa, el núcleo acaba de adquirir la morfología redondeada que caracteriza a las neuronas maduras y la dendrita apical se alarga y fortalece y se hace claramente visible en la inmunohistoquímica contra DCX o PSA-NCAM (Kempermann, 2006). Durante esta fase de expresión de DCX y calretinina tienen lugar la formación de dendritas y axones así como la maduración funcional definitiva (Brandt *et al.*,

2003). La elongación del axón ocurre rápidamente después de que las células salgan de ciclo definitivamente (Hastings y Gould, 1999) y en seguida se establecen y estabilizan los contactos con CA3.

El primer signo de madurez funcional en términos de la capacidad para generar potenciales de acción y de conectividad con sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos tiene lugar muy temprano, ya que ocurre en el momento en que expresan nestina y por tanto se encuentran aún en el estadio de precursor. En el GD, las nuevas neuronas sufren una secuencia estereotipada de cambios antes de establecer los diferentes tipos de sinapsis. Siete semanas después de la última división, las nuevas células granulares muestran propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas maduras circundantes (van Praag *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que estas nuevas neuronas tienen un umbral de excitación más bajo que las neuronas maduras ante la inducción de LTP (*long term potentiation*) (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004), uno de los mecanismos principales de la plasticidad sináptica.

Finalmente es importante tener en cuenta que, tanto durante el desarrollo como durante la neurogénesis adulta, tiene lugar la producción de un número de células que excede por mucho al número final de células que serán incorporadas a la estructura. De ellas, las que no son necesarias son eliminadas por apoptosis (Biebl *et al.*, 2000). La mayor cantidad de muerte por apoptosis parece tener lugar cuando la célula ha adquirido la condición postmitótica, durante el periodo de expresión de DCX y calretinina (Seki, 2002).

1.8 Funciones de la neurogénesis adulta hipocampal

Aunque el significado funcional del proceso aún no está del todo esclarecido, existen bastantes evidencias que apuntan a que la neurogénesis adulta podría jugar un papel importante en el mantenimiento de algunas funciones primordiales del hipocampo como la memoria y el aprendizaje (van Praag *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2001; Aimone *et al.*, 2006). Su papel en otros comportamientos aún no han sido plenamente corroborado, pero existen numerosas evidencias que apuntan a que pueda estar implicada en otros procesos. Así, estudios recientes han demostrado que los efectos del ejercicio físico dependen inequívocamente de la neurogénesis adulta (Meshi *et al.*, 2006).

Aunque el hipocampo posee cierta capacidad de almacenaje, hoy sabemos que no se encarga de mantener las memorias almacenadas, al menos a largo plazo. Más bien, la función del hipocampo es la de encargarse de preparar aquellos eventos que deben ser almacenados a largo plazo. En la actualidad no se cuenta con evidencias irrefutables de que la neurogénesis esté directamente implicada en el almacenaje de la memoria en sí mismo, ni tampoco hay evidencias de que la memoria resida en neuronas individuales. Sin embargo, parece que el almacenaje se realiza en el conjunto de pesos sinápticos que conforman la compleja red del circuito trisináptico (Kempermann *et al.*, 2002). La introducción de nuevas neuronas significa

una mayor complejidad de información que puede ser procesada por la red. Los beneficios cognitivos de la neurogénesis no podrían ser agudos, ya que son necesarios varios días, al menos en roedores, para que una nueva neurona se encuentre integrada en el circuito. Se cree que la función de la neurogénesis es más bien la de producir un ajuste tónico a largo plazo de la red sináptica hipocampal a un nivel de mayor complejidad.

Finalmente, es importante destacar el posible papel protector de la neurogénesis adulta. El hecho de que ciertos procesos perjudiciales para el cerebro como la hipoxia, la isquemia, la apoplejía y los traumas aumenten la neurogénesis apoya esta hipótesis (Kokaia y Lindvall, 2003; Rice *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2005; Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2007).

Con la edad, la proliferación y diferenciación de las células precursoras en el GD se ve significativamente disminuida (Kuhn *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 2006). Esto podría en parte estar relacionado con el progresivo déficit cognitivo que se produce con el envejecimiento. Curiosamente, de forma reciente se ha observado que se produce un aumento de la neurogénesis en cerebros de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Curtis *et al.*, 2003) y la enfermedad de Alzheimer (AD) (Jin *et al.*, 2004b), sugiriendo que la neurogénesis, no sólo podría actuar como mecanismo protector, sino también como mecanismo compensatorio frente a la pérdida de función. Como se comentará más adelante, estos datos, sin embargo, generan controversia, ya que numerosos estudios no apoyan o contradicen, el hecho de que realmente se produzca un aumento de la neurogénesis en dichas enfermedades.

1.9 Regulación de la neurogénesis adulta en el hipocampo

En la mayoría de los trabajos publicados acerca de la neurogénesis adulta se hace referencia a la regulación de la misma en términos cuantitativos, siendo escasos los estudios acerca de aspectos cualitativos tan cruciales como el funcionamiento o la funcionalidad de las nuevas neuronas generadas. La regulación parece ser un evento multidimensional en el que las cascadas de señalización intracelular crean un escenario en el que se hace posible que la exposición a un determinado estímulo active señales de supervivencia en poblaciones celulares específicas que serán seleccionadas para continuar diferenciándose y acabar originando neuronas maduras. La ruta concreta por la que esa señal es transducida es, de nuevo, un insignificante evento de la compleja red de interacciones que regula la neurogénesis adulta hipocampal (Kempermann, 2006). La regulación de la neurogénesis hipocampal adulta no parece ser un proceso lineal, sino que parece tener lugar de manera independiente sobre proliferación, diferenciación y supervivencia (Kempermann *et al.*, 1997).

1.9.1 Factores que regulan la neurogénesis adulta hipocampal

Son muchos y muy diversos los factores tanto moleculares como ambientales que regulan el proceso. Entre los primeros se incluyen:

- **Hormonas:** Entre las que tienen influencia directa sobre la neurogénesis adulta destacan los corticosteroides. Aunque los datos acerca de su implicación en el proceso son contradictorios parece claro que, en condiciones basales, son necesarios para la correcta función del hipocampo y que, sobrepasados los niveles considerados como fisiológicos comienzan a producirse efectos perjudiciales y tóxicos que desembocan finalmente en una regulación negativa de la función hipocampal y de la tasa de neurogénesis.

Por otro lado y, aunque no se han observado diferencias cuantitativamente importantes entre ambos sexos en cuanto a neurogénesis adulta, se sabe que las hormonas sexuales (masculinas y femeninas) regulan el proceso (García-Segura y Wise, 2000; Saravia *et al.*, 2007; García-Segura, 2008).

- **Factores de crecimiento:** Son moléculas extracelulares que controlan el crecimiento celular y potencian su mantenimiento. Entre ellos destacan el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF-2) que se sabe estimula la proliferación de los precursores en la SVZ, el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), cuya acción sobre la neurogénesis adulta, a diferencia de otros factores de crecimiento se debe mayoritariamente a su forma circulante (Trejo *et al.*, 2001) y no a la local (Davila *et al.*, 2007) potenciando el proceso y aumentando la proliferación (Aberg *et al.*, 2003), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que también provoca un aumento de la proliferación tanto *in vitro* como *in vivo* (Jin *et al.*, 2002) y el factor de crecimiento neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que, de forma genérica puede decirse que regula una cadena de mecanismos promotores de la supervivencia en los que se hallan implicadas diversos puntos de control, así como complejas interacciones con otros factores de crecimiento como IGF-1.

- **Sistemas de neurotransmisión:** La innervación glutamatérgica que, en el GD proviene de las fibras de la corteza entorrinal, influye en el proceso de neurogénesis de formas muy dispares, ya que se ha observado que la lesión de dichas vías da lugar a una regulación positiva (Gould, 1994) o a la ausencia total de efectos sobre proliferación acompañada de un aumento transitorio en la supervivencia (Gama Sosa *et al.*, 2004). La serotonina también parece regular activamente el proceso (Brezun y Daszuta, 1999; Malberg *et al.*, 2000). Es importante la implicación en el mecanismo de acción de ciertos antidepresivos que actúan principalmente como inhibidores de su recaptación y que clásicamente son conocidos como reguladores positivos de la neurogénesis (Malberg *et al.*, 2000).

- **Moléculas de señalización paracrina:** Entre estas destacan reguladores negativos de la neurogénesis como los miembros de la familia de proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Fan *et al.*, 2004) y otros factores como Sonic Hedgehog (Shh) cuya acción es

pro-proliferativa y de mantenimiento de los precursores (Lai *et al.*, 2003) o como Notch, cuya activación mantiene a las células en estadio de precursor evitando la diferenciación neuronal (Chojnacki *et al.*, 2003). Por su parte, el óxido nítrico parece tener un papel dual en la regulación de la neurogénesis adulta (Cardenas *et al.*, 2005).

Finalmente es importante resaltar la importancia de otros factores no moleculares que regulan activamente la neurogénesis adulta y que pueden clasificarse en fisiológicos o patológicos:

- **Fisiológicos:** Entre ellos destaca el ejercicio físico, que parece regular positivamente el proceso (Glasper *et al.*, ; van Praag *et al.*, 1999b; van Praag *et al.*, 1999a; Trejo *et al.*, 2001; Rhodes *et al.*, 2003; Llorens-Martin *et al.*, 2006; Trejo *et al.*, 2008) provocando un aumento de la proliferación, actuando también en procesos posteriores de la maduración neuronal y promoviendo la supervivencia. Asimismo, los aumentos en neurogénesis se acompañan, en términos generales, de una mayor facilidad para la inducción de LTP en hipocampo, lo que finalmente se relaciona con mejoras en memoria y aprendizaje espacial (van Praag *et al.*, 1999b). Otros factores fisiológicos reseñables que también ejercen un efecto positivo son el enriquecimiento ambiental (Kempermann *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2004; Llorens-Martin *et al.*, 2007; Verina *et al.*, 2007) y el aprendizaje (Gould *et al.*, 1999). Entre los reguladores fisiológicos negativos de la neurogénesis el más destacable es la edad. Con el envejecimiento disminuye el número de precursores que pueden aislarse del GD (Maslov *et al.*, 2004). Otros reguladores negativos son el sueño, cuya privación prolongada o interrupción provoca efectos deletéreos sobre la producción de nuevas neuronas en el GD (Guzman-Marín *et al.*, 2007) y el estrés, que en altos niveles parece provocar el deterioro de las capacidades neurogénicas de dicha estructura (Kempermann, 2006).

- **Patológicos:** Ante situaciones de daño al cerebro, tal y como se comentó anteriormente, la neurogénesis adulta parece inducirse como mecanismo protector/compensador de la pérdida neuronal provocada. Así, la isquemia induce proliferación en varios modelos animales de infarto tanto en zonas neurogénicas como no neurogénicas (Takagi *et al.*, 1999) mediante un mecanismo NMDA dependiente (Arvidsson *et al.*, 2001). Un aumento de la proliferación en zonas neurogénicas se ha observado también tras fenómenos de hipoxia (revisado por Wiltrout *et al.*, 2007).

Por su relevancia en este trabajo, así como por la importancia de cara a posibles vías terapéuticas, **el apartado 1.11** tratará de manera más específica la implicación de la neurogénesis adulta en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer.

1.10 Neurogénesis adulta en las regiones dorsal y ventral del hipocampo

Durante el desarrollo, la neurogénesis en el GD procede a lo largo del eje longitudinal desde la región ventral y hacia la dorsal (Schlessinger *et al.*, 1975). Asimismo, existen diferencias en el momento en el que se originan las células granulares a lo largo del eje transversal (Angevine, 1965). Sin embargo, no existen evidencias claras acerca de que este patrón se mantenga en el proceso de formación de nuevas neuronas en los individuos adultos. Diversos estudios han aportado datos que permiten deducir que tales desigualdades regionales podrían persistir durante la vida adulta.

En condiciones basales, algunos trabajos han descrito diferencias en la densidad de células BrdU positivas en el hipocampo septal (dorsal) con respecto al hipocampo temporal (ventral) (Dawirs *et al.*, 1998; Ambrogini *et al.*, 2000; Ferland *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003), mientras que otros no han encontrado tales diferencias (Rao y Shetty, 2004). Sin embargo, estos datos son difíciles de comparar debido a las diferentes especies estudiadas, el análisis de secciones coronales, sagitales u horizontales o el estudio de una sola de las dos capas del GD (infra o suprapiramidal) (Ambrogini *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2003). A pesar de esto, la regulación regional de la proliferación celular podría ocurrir. De hecho, se ha observado que el aprendizaje espacial conlleva un aumento de la supervivencia de las nuevas neuronas generadas sólo en el hipocampo dorsal (Ambrogini *et al.*, 2000), mientras que se ha observado una disminución específica de la proliferación solamente en la zona ventral tras estrés crónico de intensidad moderada (Jayatissa *et al.*, 2010). Del mismo modo, el tratamiento crónico con el antidepresivo agomelatina produce un aumento de la neurogénesis adulta sólo en la porción ventral del hipocampo (Banasr *et al.*, 2004).

Recientemente, en un trabajo llevado a cabo en el hipocampo de ratones silvestres de la cepa C57BL/6 de dos meses de edad, se han encontrado diferencias topográficas en los distintos marcadores del proceso de neurogénesis adulta (Jinno y Kosaka, 2010). Así, se encontró una disminución significativa en la densidad celular de los precursores de tipo glía radial marcados con el anticuerpo BLBP en la región infrapiramidal del hipocampo ventral con respecto al resto de regiones analizadas, una mayor densidad de células DCX⁺ en la zona suprapiramidal del hipocampo dorsal y una expresión del marcador de neuronas inmaduras calretinina únicamente en la región dorsal y no en la ventral. Estos resultados podrían sugerir que el mayor reservorio de neuronas granulares inmaduras positivas para DCX en el hipocampo dorsal podría contribuir al codificado de nuevas memorias espaciales. Asimismo, la existencia del marcador calretinina solo en la región dorsal podría estar en relación con el efecto neuroprotector de las proteínas de unión a calcio (Lukas y Jones, 1994; D'Orlando *et al.*, 2002) y el consecuente mayor número de células inmaduras DCX⁺ encontradas en dicha región.

Posteriormente, un trabajo llevado a cabo por el mismo autor ha puesto de manifiesto

que la disminución de la neurogénesis adulta que tiene lugar con la edad también sigue un patrón topográfico bien definido en el hipocampo murino. Así, al igual que en ratones jóvenes, las densidades numéricas de progenitores primarios (BLBP⁺), progenitores intermedios proliferantes (PCNA⁺) y neuronas inmaduras (DCX⁺) fueron nuevamente mayores en la región dorsal en comparación con la ventral, haciéndose tales diferencias más acusadas en ratones de edad más avanzada (diez meses). Las disminuciones en cada una de estas poblaciones dependientes de la edad fueron mayores en el hipocampo ventral en comparación con el dorsal. Tales cambios topográficos en la neurogénesis adulta podrían estar implicados en los defectos afectivos y de memoria que sufren las personas mayores (Jinno, 2011).

Por último, es importante destacar que todos los trabajos mencionados aluden a tales diferencias topográficas en animales silvestres. En esta tesis se mostrará como las alteraciones observadas en el proceso de neurogénesis adulta en nuestro modelo murino transgénico que sobreexpresa GSK-3 β de forma condicional, siguen un patrón distinto en las regiones dorsal y ventral hipocampales.

1.11 Neurogénesis adulta y neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas en regiones determinadas del sistema nervioso. Se cree que esta pérdida masiva es la responsable del deterioro cognitivo y motor que experimentan los pacientes que sufren dichas enfermedades. La alteración de numerosos genes así como la implicación de toxinas ambientales, han sido propuestas como posibles causas que expliquen el proceso de neurodegeneración, aunque los mecanismos por los cuales podrían actuar no se conocen todavía. Por ello, muchas de las aproximaciones terapéuticas se han centrado en retrasar o detener dicha muerte celular (Abdipranoto *et al.*, 2008).

El descubrimiento del proceso de neurogénesis adulta plantea el hecho de que el sistema nervioso tenga una capacidad intrínseca para repararse. Además, se suscita la posibilidad de que este mecanismo pueda estar alterado en las enfermedades neurodegenerativas, de manera que aumentar la neurogénesis endógena podría ser una buena diana terapéutica para tratar dichas patologías.

Hasta el momento, existe una gran controversia acerca de lo que realmente ocurre con la neurogénesis en las patologías neurodegenerativas. Por ejemplo, en ciertos modelos animales de la enfermedad de Parkinson (caracterizada por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra), se ha observado como lesiones en dicha región estimulan la proliferación de precursores neuronales (Zhao *et al.*, 2003; Yoshimi *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2006). Otros estudios, sin embargo, han puesto de manifiesto que, aunque este hecho tiene lugar, no existen evidencias de que dichos progenitores realmente se diferencien a neuronas dopaminérgicas (Baker *et al.*, 2004; Cooper y Isacson, 2004; Steiner *et al.*, 2006; Van Kampen

y Eckman, 2006)

En el caso de la enfermedad de Alzheimer (AD), de nuevo los datos son contradictorios. Las primeras observaciones en humanos fueron realizadas en un estudio llevado a cabo por Nagy y colaboradores en 1997 (Nagy *et al.*, 1997). Este trabajo pionero resaltaba un aumento en la proliferación celular en el hipocampo de pacientes que habían sufrido la enfermedad, medido a través del marcador Ki67. En 2004, Jin y colaboradores corroboraron dicha observación restringiéndola únicamente a neuronas (Jin *et al.*, 2004b). En 2006, otro grupo detectó sin embargo una alta tasa proliferativa en cerebros preseniles de AD, si bien demostraron que la mayoría de los precursores acababan diferenciándose a células gliales (Boekhoorn *et al.*, 2006).

El estudio de la enfermedad de Alzheimer ha supuesto la generación de diversos modelos murinos como herramienta para su estudio. Los datos obtenidos en los mismos sobre neurogénesis adulta son muy variables. Así, en mutantes para la presenilina-1 (PS1) cuya alteración se encuentra patente en los casos de Alzheimer familiar (FAD), los efectos observados en neurogénesis han sido dispares, no observándose cambios en la proliferación neuronal aunque sí una menor tasa de supervivencia celular (Wen *et al.*, 2004) o bien encontrándose un incremento en la proliferación acompañada de una supervivencia disminuida (Chevallier *et al.*, 2005). Los estudios en mutantes para la proteína precursora del amiloide (APP), que da lugar al β -amiloide, componente de las placas seniles, una de las dos principales marcas histopatológicas de la enfermedad como se detallará más adelante, han dado lugar a otro amplio espectro de resultados. Entre estos, se encuentran aquellos que recogen una disminución en la proliferación de los precursores del GD (Haughey *et al.*, 2002a; Haughey *et al.*, 2002b; Dong *et al.*, 2004; Donovan *et al.*, 2006), un aumento (Jin *et al.*, 2004a; Lopez-Toledano y Shelanski, 2007; Ermini *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2008; Koleccki *et al.*, 2008) o ausencia de cambios (Verret *et al.*, 2007). Las placas de amiloide podrían por tanto tener efectos muy controvertidos sobre la neurogénesis, sugiriéndose que dicha variabilidad podría derivarse de las distintas especies oligoméricas que el péptido β -amiloide es capaz de originar.

Las mismas discrepancias se han encontrado en cuanto a diferenciación de los progenitores neurales aunque en la SVZ de estos modelos transgénicos, de modo que ciertos autores señalan una disminución de la misma (Verret *et al.*, 2007) mientras que otros no observan cambios (Rockenstein *et al.*, 2002) o registran un aumento (Lopez-Toledano y Shelanski, 2007).

Un nuevo grupo de datos derivado del estudio en dobles mutantes con alteraciones en PS1 y APP e incluso en triples transgénicos, en los que, además de verse afectadas dichas proteínas se encuentra alterada también la proteína tau, principal componente de los ovillos neurofibrilares, la segunda marca histopatológica más característica de la enfermedad de Alzheimer. En estos modelos los resultados obtenidos parecen ser algo más homogéneos,

apuntando a una disminución en la proliferación y supervivencia de los progenitores neurales tanto en la SGZ como en la SVZ (Taniuchi *et al.*, 2007; Verret *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Niidome *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009).

Finalmente, algunos estudios se han centrado sin embargo en los efectos del trasplante de precursores neuronales, observándose que, si bien estos no acaban madurando, consiguen aportar beneficios en modelos de ratón de la AD debido a la liberación del factor neurotrófico BDNF (Blurton-Jones *et al.*, 2009).

En general, los defectos en neurogénesis parecen presentarse antes de que los déficits cognitivos sean patentes, por lo que los marcadores de este proceso resultan buenos candidatos como marcadores tempranos de la enfermedad.

A pesar de todos los estudios realizados, son pocos los que ahondan realmente en el proceso completo de neurogénesis adulta, centrándose en los primeros estadios del proceso como son la proliferación y la diferenciación sin abordar en muchos casos la maduración y por tanto la correcta finalización del mismo.

En esta tesis, abordaremos el estudio de la neurogénesis desde los estadios iniciales y hasta los finales en un modelo de sobreexpresión condicional de GSK-3 β , la principal quinasa implicada en la fosforilación de la proteína tau.

2. La proteína GSK-3

En un estudio pionero cuyo objetivo era la búsqueda de proteínas quinasas que fosforilaran a la proteína tau, Ishiguro y colaboradores encontraron una quinasa clave asociada a microtúbulos que inicialmente fue descrita como tau quinasa I (Ishiguro *et al.*, 1992). Posteriormente fue reconocida como GSK-3 (Ishiguro *et al.*, 1993), una proteína quinasa implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa. En vertebrados existen dos isoformas de esta proteína codificadas por genes distintos; la GSK-3 α y la GSK-3 β (Woodgett, 1990). La isoforma más conservada evolutivamente es la β , que tiene una amplia expresión en el reino animal, mientras que la forma α se encuentra solo en vertebrados (Plyte *et al.*, 1992). Ambas se expresan de forma ubicua en todos los tejidos aunque sus niveles son particularmente elevados en el cerebro y en los axones neuronales (Woodgett, 1990; Kim *et al.*, 2006).

La proteína GSK-3 es una serina/treonina quinasa. Las dos isoformas han sido descritas en mamíferos. Comparten un 95% de identidad aminoacídica, siendo los extremos amino-terminal (N-terminal) y carboxilo-terminal (C-terminal) los que comparten una menor homología al tener la isoforma α una cola rica en glicinas en dicho extremo que está ausente en la isoforma β . Sus pesos moleculares difieren en pocos KDa, siendo GSK-3 α de mayor tamaño (51 Kda) que GSK-3 β (47 Kda) (Woodgett, 1990). La presencia de las dos isoformas

no es redundante, ya que la isoforma α no es capaz de suplir la ausencia de la β . Este hecho fue constatado al observar que ratones carentes de GSK-3 β eran letales, siendo GSK-3 α incapaz de rescatar la función de GSK-3 β (Hoeflich *et al.*, 2000).

Aunque GSK-3 β está presente en todos los estadios del desarrollo así como en el cerebro adulto, se ha observado que, en roedores, su expresión en el cerebro alcanza un pico durante las primeras semanas del desarrollo, disminuyendo considerablemente sus niveles a partir del día 20 postnatal, fenómeno que coincide con la terminación de la extensión dendrítica y la formación de sinapsis (Takahashi *et al.*, 1994; Leroy y Brion, 1999). Por el contrario, la isoforma GSK-3 α se mantiene más o menos constante a lo largo de todo el desarrollo (Takahashi *et al.*, 1994).

No existe una secuencia estricta para el reconocimiento de los sustratos, pero muchos de ellos, aunque no todos, necesitan una fosforilación previa (*priming*) por otras quinasas en una serina o treonina separada cuatro residuos del sitio de fosforilación de GSK-3, es decir en el motivo -S/T-X-X-X-S/T(P)-, lo cual posibilita su fosforilación por GSK-3.

2.1 Regulación de GSK-3

Debido a las numerosas funciones que desempeña y a los diferentes sustratos sobre los que actúa (ver apartado 2.3), la proteína se encuentra finamente regulada gracias a distintos mecanismos:

2.1.1 Regulación por fosforilación

La actividad enzimática de GSK-3 se reduce significativamente tras la fosforilación de la serina 9 en el caso de GSK-3 β y la serina 21 en el caso de GSK-3 α . La fosforilación de esta serina transforma el extremo N-terminal en un pseudosustrato el cual ocupa el sitio activo de la enzima normalmente reservado para los sustratos pefosforilados (Dajani *et al.*, 2001; Frame y Cohen, 2001).

Existen distintas quinasas capaces de fosforilar GSK-3 en serina 9/21: diferentes isoformas de la proteína quinasa C (PKC), la p70 S6 quinasa, la p90 RSK, la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa B (PKB o Akt) (Jope y Johnson, 2004). La vía de señalización mejor descrita que regula la fosforilación de GSK-3 β en serina 9 es la vía mediada por el receptor de insulina (Fig. 3). La insulina se une a su receptor lo que provoca la activación de una cascada de señalización que finalmente lleva a la fosforilación y consiguiente activación de PKB. Esta quinasa, por último, fosforila la serina 9 de GSK-3 β o la serina 21 de GSK-3 α (Jope y Johnson, 2004). La reactivación de GSK-3 β podría estar mediada por las fosfatasa PP2A y PP1 (Sutherland *et al.*, 1993; Welsh y Proud, 1993).

La fosforilación de la tirosina 216 de GSK-3 β y la tirosina 279 de la GSK-3 α es otra forma de regulación de la actividad GSK-3. Dichas fosforilaciones son necesarias para su

actividad (Hughes *et al.*, 1993).

Por último, otro mecanismo, en este caso indirecto, de regulación por fosforilación lo constituye la pre-fosforilación de sus sustratos o *priming*, comentado anteriormente. Algunas de las quinasas implicadas en dicha prefosforilación son la caseína quinasa-I (CK-I) que fosforila a la β -catenina (Rubinfeld *et al.*, 1996), la caseína-quinasa II que fosforila a la glucógeno sintasa (DePaoli-Roach, 1984) y la CDK-5 que prefosforila la proteína tau (Sengupta *et al.*, 1997; Noble *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Esta pre-fosforilación no siempre es necesaria, así, por ejemplo, la proteína tau, uno de los principales sustratos de GSK-3, puede ser fosforilada por esta

tanto en sitios “primados” como no “primados”. Sin embargo, se ha observado una mayor reducción de su afinidad por los microtúbulos solo cuando es fosforilada en sitios primados (Cho y Johnson, 2003).

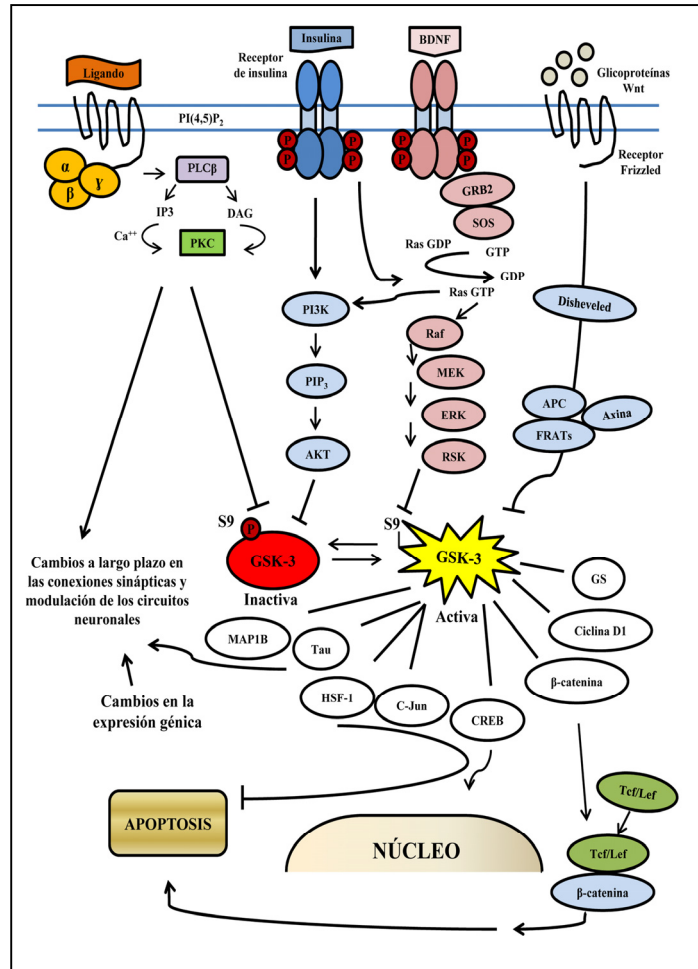


Figura 3. Esquema representativo de las diferentes vías de señalización en las que participa GSK-3 y de algunos de sus principales sustratos.

2.1.2 Regulación por formación de complejos proteicos

GSK-3 también puede regularse por la formación de complejos proteicos. En esta forma de regulación está implicada una familia de proteínas de unión a GSK-3 (GBP), en la que están incluidas FRAT-1 y 2 (Jonkers *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999), que inhiben la actividad de GSK-3 al unirse a ésta. En el lado opuesto estaría la axina, que es una proteína que al unirse a GSK-3 aumenta su actividad facilitando la fosforilación de su sustrato, en este caso β -catenina. Esto es lo que ocurre en la vía de Wnt (Fig. 3), vía fundamental en el desarrollo embrionario y una de las vías mejor caracterizadas que regulan la actividad de GSK-3 β a través de complejos proteicos. En ausencia de Wnt, la proteína adaptadora axina posibilita la unión de GSK-3, CK-I, β -catenina y otras proteínas permitiendo la fosforilación

de β -catenina por CK-I (pre-fosforilación o *priming*) y su consiguiente fosforilación por GSK-3 β . La β -catenina fosforilada es entonces ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma. Sin embargo, en presencia de Wnt se inicia una cascada de señalización en la que se activa *dishevelled* (dvl), la cual al unirse a FRAT o GBP (proteínas de unión a GSK-3), desestabiliza el complejo, quedando libre β -catenina, cuya acumulación citoplasmática y posterior translocación al núcleo supone la activación de factores de transcripción de la familia Tcf/ Lef (Jope y Johnson, 2004). Recientemente, se ha observado otra proteína implicada en esta ruta, DISC-1, que se une a GSK-3 β inhibiéndola (Mao *et al.*, 2009). DISC-1 juega un importante papel en el desarrollo y proliferación de progenitores neuronales por lo que se comentará más en detalle en el **apartado 2.4**.

Existen otros complejos proteicos en los que participa GSK-3 como el que forma con la proteína supresora de tumores (p53) o su interacción con PS1 (Jope y Johnson, 2004). En algunas ocasiones la formación de complejos proteicos puede regular la localización intracelular de GSK-3; por ejemplo, la unión a FRAT-1 posibilita su exportación del núcleo (Franca-Koh *et al.*, 2002).

2.1.3 Regulación por localización intracelular

La localización intracelular de la enzima regula el acceso de GSK-3 a sus sustratos. GSK-3 se ha considerado tradicionalmente como una proteína citoplasmática, donde sus niveles son más elevados, pero también está presente en el núcleo y en las mitocondrias donde se encuentra altamente activada en comparación con la enzima citoplasmática (Bijur y Jope, 2003).

También se encuentra en otras estructuras como en las espinas dendríticas, donde parece estar implicada en la consolidación de la memoria (Peineau *et al.*, 2007).

2.2 Recambio de GSK-3

Además de estos mecanismos de regulación, los mecanismos implicados en el recambio de GSK-3 podrían ser críticos no sólo para entender la regulación fisiológica de la enzima, sino también para comprender aquellas enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer, en las que está alterada su actividad enzimática.

GSK-3 β es una proteína con una vida media larga (Hongisto *et al.*, 2008). Aunque se desconocen los mecanismos que regulan su reciclaje o *turn-over*, datos obtenidos en nuestro laboratorio han permitido caracterizar una nueva forma de regulación de la proteína; la truncación de su extremo N-terminal por acción de la calpaína. Estos estudios ponen de manifiesto además, que la GSK-3 α es peor sustrato para la degradación por este nuevo mecanismo, indicando que ambas isoformas no poseen, probablemente, mecanismos idénticos de degradación (Goni-Oliver *et al.*, 2007).

2.3 Funciones de GSK-3

GSK-3 β desempeña funciones muy diversas entre las que se encuentran la fosforilación de sustratos de distintos tipos, como proteínas del metabolismo (glucógeno sintasa, piruvato deshidrogenasa), proteínas de señalización (proteína de señalización dependiente de AMPcíclico, receptor NGF), proteínas estructurales (tau, MAP1B) y factores de transcripción (β -catenina, CREB). Así, además de participar en distintas rutas de señalización, como las vías ya comentadas de Wnt e insulina, también juega un importante papel en la síntesis de proteínas, inhibiendo por fosforilación al factor de iniciación eucariótico 2B (eIF2B) y promoviendo por tanto la apoptosis (Pap y Cooper, 2002), en la proliferación y diferenciación celular, en el dinamismo de los microtúbulos y la motilidad celular (Frame y Cohen, 2001) y también en el fenómeno de *splicing* (Hernandez *et al.*, 2004) (**Fig. 3**).

Juega también un importante papel en el desarrollo embrionario, puesto que determina la formación del eje dorsoventral en *Xenopus* (Dominguez *et al.*, 1995; He *et al.*, 1995), siendo cruciales las vías de Wnt y Sonic Hedgehog (Shh) en las que GSK-3 está implicada directamente (Kim y Kimmel, 2006).

Como ya se expuso anteriormente, GSK-3 se expresa altamente en el sistema nervioso. A continuación se detallan algunas de las funciones de GSK-3 que presentan mayor relevancia en el sistema nervioso:

-Regulación de la arquitectura y motilidad celular : GSK-3 juega un importante papel en la regulación de la polaridad neuronal, fundamentalmente al tener como sustratos proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como tau, MAP1B o MAP2, a las que fosforila. Estas fosforilaciones regulan su unión a microtúbulos y su dinamismo (Jope y Johnson, 2004).

Se ha observado que GSK-3 β se expresa altamente durante la remodelación de las neuritas, ya que es crítica para establecer la polaridad neuronal y transformar neuritas en axones (Jiang *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2005). La inhibición de GSK-3 promueve la formación de múltiples axones y la transformación de las dendritas existentes en axones (Jiang *et al.*, 2005), mientras que su activación causa colapso del cono de crecimiento y supresión de la formación del axón (Zhou *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Chadborn *et al.*, 2006). Por otro lado, otros trabajos proponen que GSK-3 es esencial para la formación del axón (Shi *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2007).

También se ha relacionado a GSK-3 con procesos de migración neuronal (Del Rio *et al.*, 2004).

- Consolidación de la sinapsis: La presencia de GSK-3 β en espinas dendríticas, donde se produce la sinapsis (Peineau *et al.*, 2007; Peineau *et al.*, 2008), así como en la fracción sinaptosomal (Ahmad-Annuar *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2007), sugieren su participación en procesos que tienen lugar en la sinapsis. GSK-3 β está implicado en dos de los mecanismos de plasticidad sináptica implicados en la consolidación de la memoria a largo plazo: LTP

(*long-term potentiation*) y LTD (*long-term depression*), que se producen en respuesta a estímulos glutamatérgicos. Se ha descrito que GSK-3 β es activada durante la LTD y a su vez, es necesaria para la inducción de este mecanismo (Peineau *et al.*, 2007; Peineau *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado que existe inhibición de GSK-3 β cuando se induce LTP (Hooper *et al.*, 2007; Peineau *et al.*, 2007). Así, la sobreexpresión de GSK-3 β conlleva a la inhibición de LTP (Hooper *et al.*, 2007; Peineau *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007). Este hecho podría relacionarse con el déficit de memoria observado en animales que sobreexpresan GSK-3 β (Hernandez *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2006a) o que presentan la enzima sobreactivada por inhibición de PI3K y PKC (Liu *et al.*, 2003).

-Regulación de la supervivencia neuronal: GSK-3 juega un papel clave en la regulación de la supervivencia celular, pudiendo actuar como enzima pro-apoptótica y como enzima anti-apoptótica. Existen dos rutas de señalización de apoptosis: la ruta intrínseca, en la que se produce desorganización de la mitocondria y la ruta extrínseca, que es iniciada por señales extracelulares y están involucrados los llamados “receptores de muerte”. En el primer caso, GSK-3 promueve la apoptosis mientras que por la otra ruta GSK-3 tiene un efecto anti-apoptótico (Beurel y Jope, 2006).

2.4 GSK-3 y neurogénesis

Varios estudios han implicado a la glucógeno sintasa quinasa en procesos de neurogénesis. En 2007, Eom y colaboradores demostraron que la inhibición de GSK-3 con litio y otros inhibidores era capaz de proteger a células precursoras neurales (NPCs) de la muerte por apoptosis (vía intrínseca) inducida por la falta de factores de crecimiento o por la exposición a agentes causantes de daño en el ADN (Eom *et al.*, 2007). Otros trabajos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* señalan el papel del litio como regulador de los progenitores neuronales del GD a través de GSK-3 β y de la vía de β -catenina/Tcf (Boku *et al.*, 2009) provocando un aumento de la diferenciación de los mismos (Kim *et al.*, 2004).

Por otro lado, se sabe que factores de crecimiento que incrementan la proliferación celular en el GD, como el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) y el factor de crecimiento de tipo insulina tipo 1 (IGF-1), también inhiben a la GSK-3 a través de la vía de la PI3K (Jin *et al.*, 2005). Otros estudios apoyan también la idea de que GSK-3 juega un papel importante en la regulación de la proliferación celular (Cui *et al.*, 1998; Liang y Slingerland, 2003).

En 2009, un trabajo publicado nuevamente por Eom y colaboradores, destacó el papel de GSK-3 como uno de los reguladores principales de la homeostasis de los progenitores neuronales *in vivo*. Para ello, se generaron dos líneas transgénicas diferentes en las cuales se les eliminó la expresión de la isoforma β de forma específica en los precursores neuronales. Mediante esta aproximación los autores pudieron determinar que la ausencia de GSK-3

causaba una inhibición de la neurogénesis, siendo por tanto necesaria la actividad de esta quinasa para la correcta progresión y regulación de dicho proceso en el desarrollo del cerebro murino (Eom y Jope, 2009). Del mismo modo determinaron que GSK-3 ejercía sus efectos a través de β -catenina y de la vía de Notch, implicada en el mantenimiento de la condición *stem* y de la identidad de la glía radial durante el desarrollo (Kim *et al.*, 2009b).

Pero estos autores no sólo determinaron la importancia de GSK-3 durante la neurogénesis embrionaria sino también en el adulto. Así, observaron que ratones *Knock-in* en los cuales el residuo 9/21 de serina había sido sustituido por alanina impidiéndose por tanto la inhibición por fosforilación de GSK-3, presentaban una disminución de la proliferación de los precursores. Además, estos ratones mostraban una disminución de los niveles de VEGF, un factor neurotrófico que estimula la neurogénesis, sugiriendo que el ambiente podría tener un papel importante en el efecto observado en los precursores neuronales en este modelo de ratón (Eom y Jope, 2009).

La implicación de la glucógeno sintasa quinasa en la neurogénesis adulta se ha observado también en otros modelos de ratón en los que se encuentran modificados los niveles de proteínas *upstream* a GSK-3. Este es el caso de DISC-1, principalmente implicada en el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la depresión, la esquizofrenia y el trastorno bipolar. El bloqueo de DISC-1 mediante el uso de shARNs resulta en una disminución de la proliferación de los precursores neuronales tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto en un modelo de ratón. Dicho efecto sobre la neurogénesis se produce debido al efecto modulador que DISC-1 ejerce sobre GSK-3, ya que es capaz de inhibir a esta quinasa mediante su interacción física con la misma. A su vez, la disponibilidad de GSK-3 regula la abundancia de β -catenina que, en último término, tal y como otros trabajos ponen de manifiesto, es la encargada de regular la transcripción de diferentes genes implicados en neurogénesis (Mao *et al.*, 2009). Otro modelo murino en el que la alteración de una proteína *upstream* a GSK-3 afecta a la neurogénesis implicando también a esta quinasa es el del síndrome de X frágil. En este, la ausencia de la proteína FMRP (proteína de unión a ARN que regula la transcripción de mARNs específicos) tanto *in vivo* como *in vitro* también se traduce en alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta y en el aprendizaje, pareciendo probable que dicho efecto se ejerza a través de GSK-3 β , a cuyo ARN mensajero FMRP podría unirse regulando su traducción (Luo *et al.*, 2010).

2.5 GSK-3 y neurodegeneración

La muerte celular aberrante se cree que es uno de los mecanismos que subyace a la patología de muchas enfermedades neurodegenerativas (Raff *et al.*, 1993; Stefanis *et al.*, 1997). Los factores de crecimiento protegen a las neuronas de una gran variedad de estímulos apoptóticos (Levi-Montalcini, 1987; Datta, 1998) y uno de esos mecanismos protectores se le

ha atribuido a la activación de la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Yao y Cooper, 1995; Crowder y Freeman, 1998). Uno de los efectores *downstream* de esta ruta es la proteína quinasa B o Akt, que a su vez se encarga de fosforilar a GSK-3 β inactivándola (Dudek *et al.*, 1997; Moule *et al.*, 1997). Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales las neuronas adquieren resistencia frente a los estímulos apoptóticos (Pap y Cooper, 1998; Bijur *et al.*, 2000).

En las enfermedades causadas por priones, caracterizadas por procesos de muerte neuronal, proliferación glial y depósitos del péptido prión (considerado como responsable de la neurodegeneración) (Prusiner, 1998), se ha observado un incremento de la actividad de GSK-3 cuando cultivos neuronales son expuestos a la proteína priónica. Esto, además, se ve acompañado de un aumento en la fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos entre las que se encuentra tau. La sobreexpresión de dominantes negativos de GSK-3 previene de la muerte neuronal inducida por prión, indicando que la activación de la quinasa es un mediador crucial en el proceso de neurodegeneración inducido por la proteína prión.

En el caso de la enfermedad de Parkinson también se ha observado una activación de GSK-3 en cultivos neuronales expuestos a la toxina 6-hidroxidopamina (Chen *et al.*, 2004), ampliamente utilizada en los modelos químicos de esta patología.

Finalmente, la GSK-3 β ha sido propuesta como el nexo de unión entre las dos formaciones neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer; las placas seniles (acúmulos extracelulares del péptido A β) y los ovillos neurofibrilares (agregados intracelulares constituidos por la proteína tau hiperfosforilada que acaban teniendo una localización extracelular cuando la neurona muere). La desregulación de esta proteína se cree que es un hecho clave en el desarrollo de la patología (Avila *et al.*, 2004; Jope y Johnson, 2004). La exposición de cultivos primarios de neuronas procedentes del hipocampo y la corteza al péptido β -amiloide, induce la activación de la GSK-3 β (Takashima *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 2000), la hiperfosforilación de tau (Busciglio *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 1997) y la muerte celular (Takashima *et al.*, 1993; Busciglio *et al.*, 1995).

Asimismo, el bloqueo de la expresión de la GSK-3 β mediante oligonucleótidos antisentido o de su actividad mediante la adición de litio, inhibe la neurodegeneración inducida por el β -amiloide en este tipo de cultivos (Takashima *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1999). Se ha comprobado que la GSK-3 β fosforila a la proteína tau en la mayoría de los residuos que se encuentran hiperfosforilados en los ovillos neurofibrilares tanto en células transfectadas (Lovestone *et al.*, 1994) como *in vivo* (Hong *et al.*, 1997; Munoz-Montano *et al.*, 1997). Además, en cerebros *postmortem* de pacientes que sufrieron la enfermedad, se encontró que la proteína GSK-3 β colocalizaba con la forma hiperfosforilada de tau, siendo sus niveles más elevados en comparación con los niveles encontrados en cerebros de personas sanas (Yamaguchi *et al.*, 1996; Imahori y Uchida, 1997; Pei *et al.*, 1999).

Por último, hay que tener en cuenta que, en la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar (FAD), las mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide (APP) y las presenilinas 1 y 2 (PS-1 y PS-2) promueven el desarrollo de la enfermedad (Price y Sisodia, 1998), siendo el aumento de la actividad de GSK-3 un factor común en la vía *downstream* de las proteínas codificadas por dichos genes (Baki *et al.*, 2004; Avila, 2006; Kimura *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2007).

3. La proteína tau como principal sustrato de GSK-3 β

3.1 Generalidades

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Se localiza mayoritariamente en las neuronas y preferentemente en los axones, aunque también puede estar presente en células gliales. La primera función que se le atribuyó fue la capacidad de facilitar la polimerización de los microtúbulos y su estabilización (Drubin *et al.*, 1986). Además, parece desempeñar un papel importante en el crecimiento neurítico y en la determinación de la polaridad neuronal (Caceres y Kosik, 1990). También se ha postulado su participación en el sistema de transporte a lo largo del microtúbulo, al interferir en la unión de la quinesina, inhibiendo así el transporte anterógrado (Ebner *et al.*, 1998).

Existe un único gen humano de la proteína tau que se localiza en el cromosoma 17q21 y contiene 16 exones (Neve *et al.*, 1986). En el SNC adulto humano se expresan seis isoformas diferentes de tau debido al procesamiento alternativo de su ARN mensajero. Las distintas variantes de la proteína tau difieren unas de otras en la presencia de tres o cuatro repeticiones en la región C-terminal (exón 10) de la molécula (dominios de unión a microtúbulos) y la presencia o ausencia de uno o dos insertos en la región N-terminal (exones 2 y 3) (Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b). Estas isoformas se expresan de forma diferencial durante el desarrollo de tal forma que sólo una, caracterizada por la ausencia de insertos en la región N-terminal y la presencia de tres repeticiones en el extremo C-terminal (0N/3R), está presente en estadios fetales, mientras que las seis isoformas se expresan durante la etapa adulta siendo los niveles de π -3R y π -4R similares. Estudios previos han demostrado, por su parte, que en el cerebro adulto de roedores las únicas isoformas de tau existentes son aquellas tres que presentan 4 repeticiones (π -4R) en el dominio de unión a microtúbulos (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989; Janke *et al.*, 1999), produciéndose un cambio hacia la expresión única de esta isoforma a partir de la segunda semana postnatal. Este cambio en los patrones de expresión de la proteína tau en ratones, coincide temporalmente con la formación del hipocampo y las neuronas hipocámpales (Larcher *et al.*, 1992; Andorfer *et al.*, 2003; Takuma *et al.*, 2003).

La expresión de las variantes 3R podría estar relacionada con la mayor plasticidad requerida durante el desarrollo (Goode y Feinstein, 1994) y la formación y elongación de neuritas (Shea *et al.*, 1992; Knowles *et al.*, 1994) ya que dichas isoformas presentan una afinidad menor en su unión a microtúbulos que las isoformas 4R (Dayanandan *et al.*, 1999).

Tau puede sufrir diversas modificaciones post-traduccionales, entre ellas fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, desamidación, proteólisis, oxidación, nitración y glicación (Avila *et al.*, 2004). Debido a su presencia en los ovillos neurofibrilares en forma hiperfosforilada, la fosforilación es la modificación de tau más estudiada.

La isoforma más larga de tau contiene 79 residuos de serina o treonina susceptibles de fosforilación y, hasta el momento, se han descrito al menos 30 residuos fosforilados (Pevalova *et al.*, 2006). El grado de fosforilación de la molécula depende de la acción conjunta de quinasas y fosfatasas. Entre las primeras, GSK-3 es la más importante; entre las segundas, PP2A es la fosfatasa responsable de la desfosforilación en la mayor parte de los sitios fosforilados (Goedert *et al.*, 1995).

3.2 Tau y neurogénesis adulta

El proceso de neurogénesis adulta recapitula los eventos de formación neuronal que tienen lugar durante el desarrollo (Ming y Song, 2011). Así, en cuanto a la expresión de las distintas isoformas de tau se sabe que la variante fetal carente de insertos N-terminales y con 3 repeticiones en su extremo C-terminal (π -0N/3R) persiste en el cerebro adulto únicamente en neuronas de nueva formación. Inyecciones intraperitoneales de BrdU en ratones demuestran que, 14 días post-inyección se produce un máximo en el número de células doble positivas para BrdU y π -3R desapareciendo a los 28 días el marcaje para la variante fetal de tau en las neuronas de nueva formación en la SGZ hipocampal (Bullmann *et al.*, 2007). Durante la neurogénesis adulta, la variante 0N/3R se expresa en conjunción con otras dos proteínas de unión a microtúbulos como son la DCX y la proteína mediadora de la respuesta a colapsina tipo 4 (CRMP-4) así como PSA-NCAM. Además, es preciso tener en cuenta que esta isoforma no sólo es expresada en células precursoras sino que está presente también en neuronas maduras del bulbo olfatorio, el hipotálamo posterolateral, el núcleo de Raphe y el *locus coeruleus* entre otras regiones del cerebro en las que también se ha encontrado un patrón similar de expresión de DCX, CRMP-4 y PSA-NCAM. Esta retención del fenotipo juvenil en algunas neuronas podría asociarse con una plasticidad neuronal funcionalmente significativa (Bullmann *et al.*, 2010).

Por otro lado, un estudio llevado a cabo en animales transgénicos que expresan la isoforma humana π -2N/4R en un fondo murino nulo para la proteína tau pone de manifiesto como esta inhibe la proliferación y promueve la diferenciación neuronal y el crecimiento

axonal probablemente gracias a la estabilización de la red de microtúbulos (Sennvik *et al.*, 2007).

Finalmente, algunos trabajos similares, aparte del que se desarrollará en esta tesis, han resaltado la importancia del proceso de fosforilación de la proteína tau en la neurogénesis adulta. Por un lado, Hong y colaboradores demuestran la presencia de epítomos fosforilados de tau sólo en neuronas inmaduras del GD y atribuyen a GSK-3 un papel esencial en dichos procesos (Hong *et al.*, 2010). Por otro lado, los mismos autores en un estudio reciente, sugieren que dichos procesos de fosforilación de la proteína tau y su mediación por GSK-3 no resultan esenciales para la formación de nuevas neuronas en la SVZ, la otra región potencialmente neurogénica del cerebro (Hong *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

En esta tesis doctoral nos propusimos estudiar las alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta derivadas de la sobreexpresión de GSK-3 β y la posible reversión de las mismas tras la administración de doxiciclina, antibiótico que administrado en el agua de bebida consigue reprimir la expresión del transgen en el modelo transgénico condicional Tet/GSK-3 β . También quisimos determinar las diferencias a nivel bioquímico, celular y funcional entre las regiones dorsal y ventral hipocampales y por último, la posible implicación de la proteína tau (principal sustrato de GSK-3 en el SNC) en todo el proceso de formación de nuevas neuronas en el adulto. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar, utilizando el modelo animal transgénico de sobreexpresión condicional Tet/GSK-3 β , los defectos en neurogénesis adulta causados por el aumento en la actividad de dicha quinasa. Determinar si la administración de doxiciclina en el agua de bebida consigue revertir los efectos deletéreos provocados por la sobreexpresión (estudio de reversión).
2. Determinar las diferencias entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo tanto a nivel celular como bioquímico y las posibles implicaciones funcionales que estas diferencias pueden suponer. Estudiar si los defectos en neurogénesis adulta afectan por igual a ambas regiones.
3. Estudiar la implicación de la proteína tau y los eventos de fosforilación que esta sufre, en el proceso de neurogénesis adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Reactivos

Doxiciclina (doxy), 5-yodo-2'-deoxiuridina (Yododeoxiuridina; IdU), 5-cloro-2'-deoxiuridina (Clorodeoxiuridina; CldU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (Boehringer Mannheim).

1.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección de proteínas en SDS-PAGE (WB), en inmunofluorescencia (IF) y en inmunohistoquímica (IHQ) se describen en la [tabla I](#). En los ensayos de *Western blot* (WB) se utilizó como anticuerpo secundario anticuerpo de conejo anti-ratón a una dilución 1/1000 (DAKO) y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo a una dilución 1/1000 (DAKO). En los estudios inmunohistoquímicos se emplearon los anticuerpos secundarios cabra anti-conejo y conejo anti-cabra conjugados con biotina, a una dilución 1/200 (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories). En los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios conjugados Alexa: burro anti-ratón, anti-rata, anti-conejo o anti-cabra Alexa 488/555/647/633 a una dilución de 1/500 (Molecular Probes, Millipore). Para el marcaje de núcleos se utilizó el 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Anticuerpos primarios	Proteínas/epítomos	Especie	Casa comercial (proveedor)	Dilución WB	Dilución IF	Dilución IHQ
Anti-nestina	Filamento intermedio nestina	Ratón	BD Biosciences		1/100	
Anti-GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Conejo	Promega		1/500	1/250
Anti-BLBP	Proteína de unión a ácidos grasos BLBP	Conejo	Abcam		1/200	
Anti-BrdU/CldU	5-bromo/cloro-2' deoxiuridina	Rata	Accurate Chemical & Scientific Corp		1/400	
Anti-IdU	5-yodo-2' deoxiuridina	Ratón	BD Biosciences		1/500	
Anti-Fosfo Histona H3	Fosfo-Histona H3 (Serina 10)	Conejo	Millipore		1/250	
Anti-doblecortina	Extremo C-terminal de la doblecortina	Cabra	Santa-Cruz		1/500	
Anti-calbindina	Proteína de unión a calcio, calbindina	Conejo	Millipore		1/500	
Anti-calretinina	Proteína de unión a calcio, calretinina	Conejo	Swant		1/200	

Anticuerpos primarios	Proteínas/epítopos	Especie	Casa comercial (proveedor)	Dilución WB	Dilución IF	Dilución IHQ
Anti-NeuN	Proteína de unión al ADN, NeuN	Ratón	Millipore		1/500	
Anti- β -galactosidasa (β -gal)	β -galactosidasa	Ratón	Promega	1/5000	1/5000	
Anti-GSK-3 β	GSK-3 β	Ratón	Cell Signaling	1/1000		
Anti-fosfo serina 9-GSK3 β	GSK-3 β fosforilada en serina 9	Conejo	Cell Signaling	1/500		
Anti-Myc	Myc (GSK-3 β transgénica)	Ratón	Hibridoma		1/100	
Anti-Akt	Proteína Akt (PKB)	Conejo	Cell Signaling	1/1000		
Anti-fosfo-Akt (Ser473)	Fosfo-Akt (Ser473)	Conejo	Cell Signaling	1/1000		
PHF-1	Fosfo-tau (Ser396-Ser404)	Ratón	Cedido por el Dr. P. Davies (NY, USA)		1/150	
AT-8	Fosfo-tau (Ser202)	Ratón	Innogenetics, Gante, Bélgica		1/100	
12-E8	Fosfo-tau (Ser262)	Ratón	Cedido por el Dr. P. Seubert, (San Francisco, CA, USA)		1/100	
7.51	Tau murino y humano (región de unión microtúbulos)	Ratón	Cedido por el Dr. Wischik (Uk)		1/100	
Anti β -actina	β -actina	Ratón	Sigma-Aldrich	1/5000		
Anti α -tubulina	α -tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich	1/5000		
Anti-Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio Iba-1	Conejo	Wako Pure Chemical Industries			1/500
Anti-fractina	Fragmento escindido de la actina	Conejo	BD Pharmingen		1/500	

Tabla I. Relación de anticuerpos primarios y las diluciones a las que se utilizaron en *Western Blot* (WB) e inmunofluorescencia (IF).

1.3 Animales

El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética de la Universidad Autónoma de Madrid.

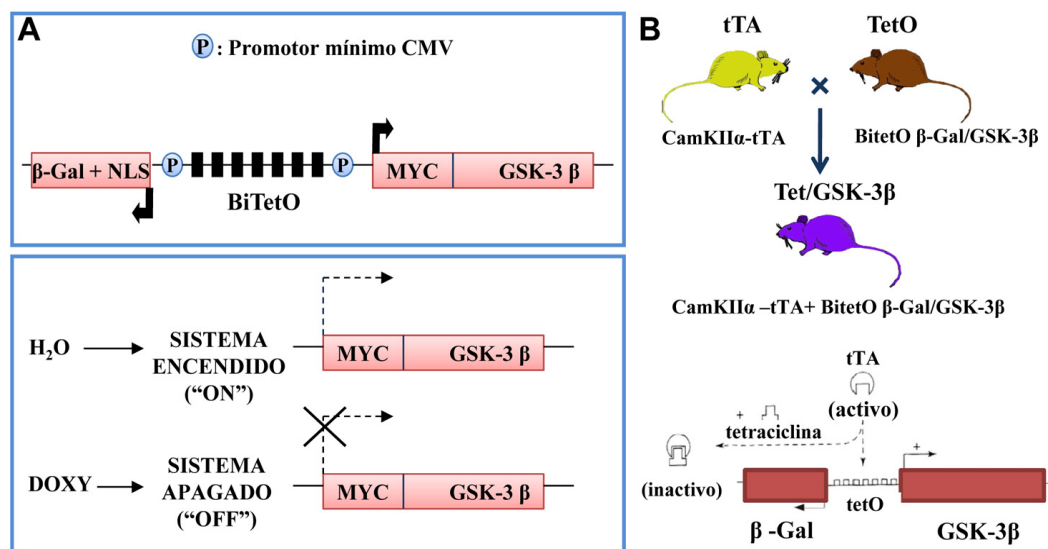


Figura 4. Esquemas de la construcción transgénica y los cruces de las distintas líneas para obtener el ratón Tet/GSK-3β. **A.** En el cuadrante superior aparece una representación esquemática del promotor bidireccional BiTetO. El promotor consiste en siete copias de la secuencia palíndrica del operador Tet flanqueado por la secuencia del promotor del citomegalovirus (CMV) en orientaciones divergentes (P). Este promotor es seguido por la secuencia de GSK-3β cADN (con el epítipo de Myc en el extremo 5'-terminal) en una dirección y en la otra, por la secuencia de β-galactosidasa (LacZ) incluyendo una secuencia de localización nuclear (NLS). En el cuadrante inferior se representa esquemáticamente cómo la expresión del transgen es abolida mediante la administración del análogo de tetraciclina, doxiciclina (doxy). **B.** Los ratones Tet/GSK-3β proceden de los cruces entre ratones CamKIIα-tTA (línea tTA) y ratones BitetO-Gal/GSK-3β (línea TetO). La coexpresión de los transgenes se encuentra mediada por el transactivador tTA reprimible por tetraciclina. Este, se une a la secuencia BiTetO para inducir la expresión de GSK-3β y β-gal a través del promotor mínimo de citomegalovirus. En presencia de tetraciclina o de sus análogos, tTA sufre un cambio conformacional que le impide unirse a la secuencia BiTetO y por tanto activar la expresión de los transgenes.

Los estudios de las alteraciones en neurogénesis así como los de reversión se llevaron a cabo en el modelo de ratón transgénico Tet/GSK-3β. En dicho modelo, se produce la sobreexpresión de GSK-3β restringida a regiones del cerebro relevantes para la enfermedad de Alzheimer (Lucas *et al.*, 2001) y dicha sobreexpresión es reprimible gracias a la administración de doxiciclina (doxy) en el agua de bebida. Estos animales dobles transgénicos proceden del cruce de la línea tTA y la línea BiTetO. La primera expresa el transactivador reprimible por tetraciclina (mantenido en heterocigosis debido a la letalidad del transgen en homocigosis) bajo el promotor de la calcio calmodulina quinasa IIα (CamKIIα); la segunda porta, en una

única construcción, las secuencias codificantes para la enzima GSK-3 β con un epítipo Myc y para la proteína reportera β -galactosidasa. Para que estos dos transgenes se transcriban es necesaria la unión del transactivador tTA a la secuencia operadora. El esquema del modelo transgénico aparece resumido en la [figura 4](#).

Como ratones control se emplearon los descendientes silvestres (*Wild type* = Wt) procedentes del cruce de la línea tTA por la línea de ratones silvestres C57BL/6.

Para los estudios de la implicación de la proteína tau en el proceso de neurogénesis, se emplearon animales Wt de 1 mes de edad así como animales Tau *Knock-out* (KO) que carecen de dicha proteína (Dawson *et al.*, 2001).

Los animales fueron alimentados y criados en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Los cuidadores agruparon a los ratones en un número de 4 por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum* y los mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 y 12 horas respectivamente con el inicio de la luz a las 7 a.m.

1.4 Diseño experimental

Para el estudio de las alteraciones en la neurogénesis adulta así como de reversión se emplearon 6 grupos experimentales de animales con edades comprendidas entre los 1 y los 13 meses de edad a los que se les suministró doxiciclina (2mg/ml) en la bebida durante 6 semanas (ratones Tet/GSK-3 β doxy), tiempo que, en estudios previos, se ha determinado como el adecuado para conseguir el silenciamiento del transgen (Sistema “OFF”) (Engel *et al.*, 2006a). Los trabajos se completaron con el estudio de animales a los que se les administró doxiciclina a distintos tiempos y a los que se les sometió a un régimen específico de pinchazos de análogos de timidina. En la [figura 5](#) quedan resumidos esquemáticamente los 6 grupos analizados con el régimen de pinchazos suministrados y sus respectivas dosis así como los tratamientos con doxiciclina. En todos los experimentos se emplearon como controles animales Tet/GSK-3 β sin tratar (Tet/GSK-3 β control; sistema “ON”) y animales Wt.

Las alteraciones diferenciales en las regiones dorsal y ventral del hipocampo fueron estudiadas en animales Tet/GSK-3 β de 2 meses de edad y sus respectivos controles silvestres.

Para las implicaciones de la proteína tau en el proceso de neurogénesis se emplearon animales silvestres y Tau KO de 1 mes de edad.

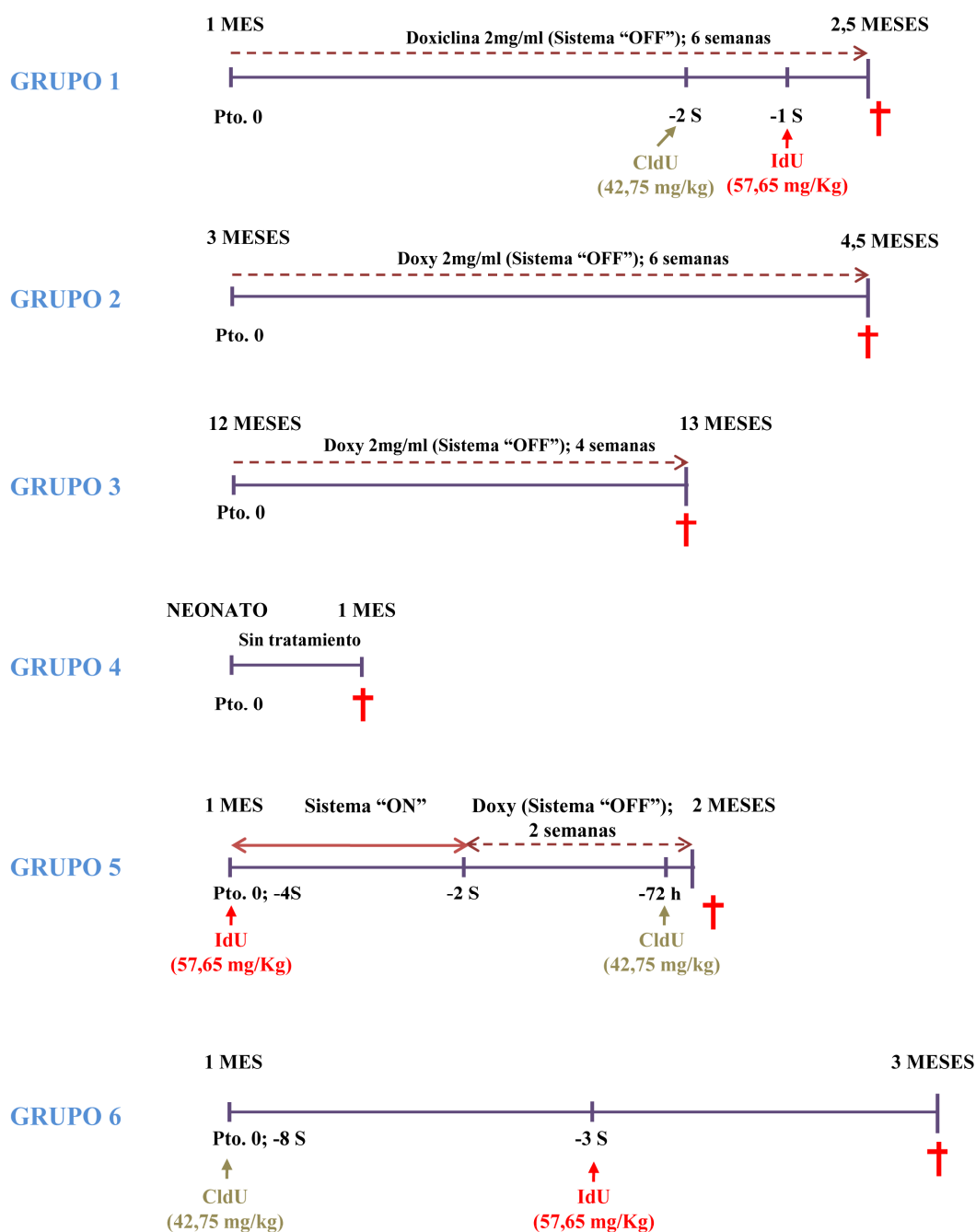


Figura 5. Esquema representativo de los grupos de animales transgénicos utilizados y los tratamientos aplicados a cada uno. Se indican las edades iniciales (pto. 0) y las finales (momento del sacrificio señalado con una cruz roja). Las flechas señalan el momento de las inyecciones con los distintos análogos de timidina (CldU e IdU) y sus correspondientes dosis, indicados como tiempo restante para el sacrificio. En todos los casos los ratones fueron inyectados intraperitonealmente dos veces diarias durante tres días consecutivos exceptuando el punto -72 h en el que se inyectaron dos únicas dosis mañana y tarde. En los esquemas se representan también los tratamientos con doxiciclina (flecha discontinua; sistema "OFF") y por tanto los puntos temporales en los que el sistema transgénico se encontraba apagado (flecha continua= sistema "ON"). Cada grupo incluye también animales Wt y animales transgénicos que recibieron el mismo régimen de pinchazos pero no fueron tratados con doxiciclina (Tet/GSK-3 β control) ; S= semanas antes del sacrificio.

2. Metodología

2.1 Disecciones y tratamiento del tejido

Todos los animales empleados fueron sacrificados utilizando una cámara de CO₂. A continuación, se diseccionaron para obtener el cerebro. Uno de los hemisferios cerebrales se destinó a técnicas inmunohistoquímicas, para lo cual fue necesario introducir todos en paraformaldehído (PFA) al 4 % para su fijación (una noche a 4° C). 24 horas después, fueron traspasados a una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % en PBS. Del otro hemisferio se extrajo una pequeña parte para llevar a cabo el ensayo con X-gal (5 ml de tampón PBS 1X, 50 µl de K₃, 50 µl de K₄ y 125 µl de X-gal). Cuando este sustrato se añadió al medio, el X-gal se hidrolizó por acción de la enzima β-galactosidasa tiñendo el tejido de azul en aquellas secciones obtenidas de animales transgénicos. El resto del hemisferio se diseccionó para obtener el hipocampo completo o dividido en las regiones dorsal/ventral según el experimento, para su posterior homogenización que será descrita en el [apartado 2.2.3](#). Por su parte, las mitades fijadas y crioprotegidas se recuperaron, secaron y se incluyeron en bloques de Tissue-Tek OCT (Sakura) para la posterior obtención de secciones sagitales del tejido de 30 µm de grosor con un microtomo de congelación o criostato (Leica). Las secciones se recogieron en una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol al 30 %, glicerol al 26 % y tampón fosfato 0,1M pH 7.

2.2 Técnicas bioquímicas

2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo el ADN genómico de una pequeña porción de cola de los animales. La porción de cola fue digerida con 10mg/ml proteinasa K (Merck) en tampón de lisis (NaCl 100mM, EDTA 100mM, Tris-HCl 50mM pH 8, 1 % SDS) a 55°C durante toda la noche. El ADN se precipitó con isopropanol y etanol frío mediante centrifugación, se dejó secar al aire y se resuspendió en agua destilada. A continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis y Faloona, 1987), en la cual se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la [tabla II](#).

Para el genotipado de BiTetO y CaMKIIα-tTA, la PCR se realizó en un medio que contenía el tampón de la Taq ADN polimerasa (5X), dNTP 0,25mM, MgCl₂ 1,5mM, oligo sentido 0,5µM, oligo antisentido 0,5µM, 2µl de DNA y 1,25U de Taq ADN polimerasa (Promega), en un volumen final de 50µl.

El protocolo de amplificación para los primers consistió en 30 ciclos de 40 segundos a 94°C seguido de 40 segundos a 53°C y 1 minuto a 72°C. La amplificación dio lugar a un

fragmento de 570 pares de bases (pb) en el caso de la línea tTA y a un fragmento de 650 pb en el caso del transgen BiTetO. Esto se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 2 % con Bromuro de Etidio.

TRANSGEN	OLIGONUCLEÓTIDOS GENOTIPADO	
	SENTIDO	ANTISENTIDO
TetO β -Gal/GSK-3 β	CATGGTCAGGTCATGGATGAGC	TAATCAGCCACTGATCCACCCAG
CamKII- α -tTA	ACTAAGTCATCGCGATGGAGC	CGAAATCGTCTAGCGCGTCGG

Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos empleados para amplificar los transgenes indicados. Todas las secuencias se indican en sentido 5'-3'.

2.2.2 PCR cuantitativa (*qRT-PCR*)

Para este estudio se analizaron animales del **grupo 1** (Fig. 5). Tanto la extracción de ARN como el diseño de oligonucleótidos y el experimento de *qRT-PCR* fueron llevados a cabo por el servicio de genómica del SIDI (Parque Científico de la Universidad Autónoma de Madrid).

Se utilizó el reactivo *SYBR Green* para detectar los niveles de expresión de los genes recogidos en la **tabla III**. El *SYBR Green* es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y, al hacerlo, incrementa fuertemente su fluorescencia. Al unirse al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, este reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN. La reacción de 10 μ l contenía 1 μ l de molde (ADN complementario o cADN), 5 μ l de la mezcla de PCR de *SYBR Green* (Applied Biosystems) y 150 nM de cada par de oligonucleótidos, sentido y antisentido. Los niveles de expresión de los genes analizados se normalizaron respecto a los del gen 18s ribosomal murino. Además, se llevó a cabo un control negativo de la reacción al que no se añadió molde (H_2O en lugar de cADN), y un control para comprobar la ausencia de ADN genómico en cada muestra (RT- en lugar de cADN).

El protocolo de amplificación consistió en un paso de 10 minutos a 95°C (activación de la Taq polimerasa) seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C (desnaturalización y anillamiento-extensión). Tras la amplificación, se obtuvo la curva de disociación aumentando progresivamente la temperatura de 60°C a 95°C. La fluorescencia emitida se adquirió en cada fase de anillamiento mediante el sistema de detección del modelo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems).

GEN	PROTEÍNA	OLIGONUCLEÓTIDOS <i>qRT-PCR</i>	
		SENTIDO	ANTISENTIDO
Rn18s	ARN RIBOSÓMICO 18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
Bdnf	BDNF	AGTCTCCAGGACAGCAAAGC	TGCAACCGAAGTATGAAATA-ACC
Vegfa	VEGF	GTACCTCCACCATGCCAAGT	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC
Igfbp3	IGFBP-3	GCAGCCTAAGCACCTACCTC	TCCTCCTCGGACTCACTGAT
Ntrk2	TrkB	TGTTGCTGACCAAAGCAATC	CCAAGTTGAGCAGGAGCAAC
Gria1	GLUR1	AGGGATCGACATCCAGAGAG	TGCACATTTCCTGTCAAACC
Gria2	GLUR2	CCAATGGGATAAGTTCGCATA	GCACAGCTTGCAAGTGTGA
Gria3	GLUR3	CCACTTGGATTCTCTCAA-TAGT	GCATACACCCCTCTGGAGAA
Gria4	GLUR4	CTGCCAACAGTTTGTGTG	AAATGGCAAACACCCCTCTA
Gad2	GAD65	TGTAGCTGACATCTGCAAAA-AGTA	GGGACATCAGTAACCCTCCA
Grin1	GRIN1	TGTCATCCCAAATGACAGGA	GGGTTCTTGGTGGATTGTCA
Grin2a	GRIN2A	GGGTTACAACCGGTGCCTA	CTTTGCCGATGGTGAAAGAT
Grin2b	GRIN2B	TGCTGGATTTCGTCTCCTCT	ACGCCAGCTGTAGAAAGG
Grin2c	GRIN2C	ACATGGTGCGATACAACCAG	TCATAGATGAAGGCGTCCAGT
Grin2d	GRIN2D	ACATGGTGCGATACAACCAG	TCATAGATGAAGGCGTCCAGT
Ifng	IFN- γ	GGAGGAACTGGCAAAAGGAT	TTCAAGACTTCAAAGAGTCT-GAGG
Cx3cl1	FRACTALKINA	CGCGTTCTTCCATTTGTGTA	CATGATTTCGCATTTCTGTA
Cx3cr1	RECEPTOR FRACTALKINA	AAGTTCCCTTCCCATCTGCT	CAAAATTCTCTAGATCCAGTT-CAGG

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la *qRT-PCR*. Todas las secuencias se indican en sentido 5'-3'.

Para comprobar la especificidad de la reacción, se analizaron las curvas de disociación correspondientes para cada par de oligonucleótidos. La medida del valor del ciclo umbral (*CT*; *cycle threshold*) de cada muestra para cada gen, realizada por triplicado, se normalizó con respecto al valor *CT* del gen 18s para esa muestra, obteniendo el valor ΔCT . El valor *CT* es inversamente proporcional a la cantidad inicial de cADN en la muestra. El aumento de fluorescencia en cada ciclo es exponencial, por lo que, a la hora de representar los resultados obtenidos, el nivel de expresión (moléculas de cADN iniciales) se calculó como $2^{-\Delta CT}$ y se representó en forma de porcentajes, dando el valor 100 % al nivel de expresión de cada gen en los ratones silvestres.

2.2.3 Preparación de extractos proteicos

Los extractos totales de proteína procedentes de tejido cerebral se homogeneizaron en Rippa Buffer de composición Tris-HCl 50Mm pH [7,4], NP-40 1 %, NaCl 150Mm, EDTA 1Mm, deoxicolato de Na 0,25 %, inhibidores de fosfatasas (NaF 1Mm, Na_3VO_4 1Mm y ácido okadaico 1 μ M) y una mezcla de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche). Posteriormente, se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.2.4 Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (*Western Blot*)

Los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis compuesto por Tris pH 6.8 250mM, SDS 4 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol 0,0006 %. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS, y, posteriormente, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad (150mA durante 1 hora). Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. A continuación, se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5 % (p/v) en PBS-0.1 % Tween-20 (v/v) durante 45 minutos, tras lo cual se procedió a la incubación con el anticuerpo primario diluido en medio de bloqueo toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados y sus respectivas concentraciones quedan resumidos en la [tabla I](#). Después, las membranas fueron lavadas 2 veces durante 10 minutos con PBS-0.1 % Tween-20. Para la inmunodetección se usaron anticuerpos secundarios de conejo anti-ratón o cabra anti-conejo acoplados a peroxidasa (HRP), diluidos en medio de bloqueo (1/1000) (Life Technologies). Las membranas fueron incubadas durante 45 minutos con los anticuerpos secundarios para posteriormente ser lavadas cuatro veces (lavados de 10 minutos cada uno) con PBS-0.1 % Tween-20. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron visualizadas utilizando el sistema ECL de Amersham. La cuantificación de la inmunoreactividad se llevó a cabo por escáner densitométrico (Bio-Rad; GS-710 Calibrated

imaging densitometer). Los valores de densitometría obtenidos con estos anticuerpos en el rango lineal de detección, se normalizaron con respecto a los valores obtenidos con el anticuerpo anti- α -tubulina o anti- β -actina para corregir cualquier desviación en las cantidades de proteínas cargadas.

2.2.5 Array de citoquinas

El array de citoquinas se llevó a cabo utilizando el Kit *Ray Bio® Mouse Cytokine Array 3* (RayBiotech, Inc.). Los hipocámpos procedentes de animales de dos meses y medio de edad silvestres (Wt), transgénicos (Tet/GSK-3 β control), transgénicos tratados con doxiciclina (Tet/GSK-3 β doxy) y silvestres tratados con doxiciclina (Wt doxy) (**Grupo 1. Ver figura 5**) fueron homogeneizados en Buffer de Lisis 2X proporcionado por el Kit, diluido con H₂O hasta una concentración de 1X. Tras la extracción, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm y se tomaron los sobrenadantes. A continuación, se determinó la concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Los ensayos para los tres grupos animales se realizaron en 4 membranas independientes (proporcionadas en el Kit). Para cada membrana se emplearon 250 μ g de proteína. Esta cantidad resultó de la mezcla de 35,71 μ g de proteína de cada animal (7 animales en total por grupo), con el fin de obtener una muestra final representativa de cada grupo analizado. Dicha muestra fue preparada en un volumen final de 1ml utilizando para la dilución Buffer de bloqueo 1X. Finalmente, se volvió a medir la concentración de proteína para minimizar al máximo los posibles errores de pipeteo.

Una vez preparadas las muestras se llevó a cabo el array siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Brevemente, las membranas se bloquearon durante 30 minutos con Buffer de bloqueo 1X. A continuación, se incubaron con las muestras correspondientes durante 2 horas finalizadas las cuales se realizaron 3 lavados de 10 minutos con los Bufferes I y II alternativamente. Tras esto, se realizó la incubación durante toda la noche y a 4°C con la mezcla de anticuerpos primarios proporcionada por el Kit, que es capaz de detectar 62 citoquinas diferentes. Nuevamente se realizaron lavados del mismo modo indicando anteriormente y se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con biotina durante otras 2 horas. Tras una nueva serie de lavados, las membranas fueron incubadas durante 2 horas con una solución de streptavidina acoplada a peroxidasa (HRP). Finalmente, se lavaron de nuevo alternativamente con los Bufferes de lavado I y II y se incubaron 2 minutos con la solución de revelado proporcionada por el Kit. El revelado y cuantificación de la inmunoreactividad se llevó a cabo del mismo modo descrito en el [apartado 2.2.4](#). Los valores de densitometría de cada citoquina analizada se corrigieron por los valores de los controles internos presentes en cada membrana.

Algunas de las citoquinas analizadas en el array fueron validadas mediante

experimentos de PCR cuantitativa tal y como se describió en el [apartado 2.2.2](#).

2.3 Técnicas histológicas

2.3.1 Inmunohistoquímica

Las secciones depositadas en solución crioprotectora se traspasaron a PBS. A continuación se incubaron con H_2O_2 al 1 % en PBS durante 45 minutos para inactivar la peroxidasa endógena del tejido. Se lavaron 2 veces durante 10 minutos con PBS y se bloquearon utilizando PBS, BSA al 10 %, suero bovino fetal (FBS) y Tritón X-100 0,2 %. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario ([ver tabla I](#)) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo durante 1 hora. Nuevamente, se lavaron las secciones 3 veces durante 10 minutos con PBS y se incubaron 1 hora con el complejo Avidina-peroxidasa (ABC) que reconoce las moléculas de biotina acopladas al anticuerpo secundario. Tanto el anticuerpo secundario como el complejo ABC, se incluyen en el Kit Elite Vectastain (Vector Laboratorios, Burlingame, CA). Finalmente, se realizaron 2 últimos lavados de 10 minutos con PBS y se procedió al revelado, para lo cual se aplicó una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada; una tableta en 10 ml de PBS y 10 μ l de H_2O_2 al 3 %). El DAB, en presencia de H_2O_2 , se oxida originando un precipitado de color marrón. Cuando el tejido presentó una coloración suficiente, se detuvo la reacción traspasando las secciones a agua destilada. Por último, se procedió al montaje de las mismas en portaobjetos. Como medio de montaje se empleó FluorSave. Las fotografías de las secciones se obtuvieron con una cámara Coolsnap FX color (Roper Scientific) acoplada a un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss).

2.3.2 Inmunofluorescencia de tejido

Las secciones fueron traspasadas a una solución de PB, BSA 1% y Tx-100 1% (solución de bloqueo). En esta misma solución se preparó el anticuerpo primario correspondiente con el que se incubaron los cortes durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados quedan resumidos en la [tabla I](#). Tras realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de bloqueo, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios de burro Alexa-conjugados (anti-ratón, anti-conejo, anti-cobaya o anti-cabra Alexa 488/555/647/633). Finalmente, después de lavar con solución PB, los cortes fueron incubados con DAPI (1/10000) (Calbiochem) durante 10 minutos. Las secciones se montaron en portaobjetos empleándose el FluorSave como medio de montaje.

Las imágenes de las secciones fueron tomadas usando un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss).

2.3.3 Cuantificación de células

Los células positivas para PH3, CldU, IdU, fractina, Myc, GFAP e Iba-1 fueron cuantificadas en una serie de cortes tanto de las zonas dorsal y ventral del GD de animales silvestres y animales transgénicos usando un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) (inmunofluorescencia) o una cámara Coolsnap FX color (Roper Scientific) acoplada a un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) (inmunohistoquímica). Los astrocitos se consideraron reactivos cuando presentaron hipertrofia y numerosas proyecciones más cortas y numerosas (Ridet *et al.*, 1997). El número de células positivas para cada marcador se dividió entre el volumen de GD con el fin de obtener datos de densidad (células/mm³). Para determinar el volumen, se midió el área del GD de cada sección en la que se realizó el conteo de células delineando el borde de la capa granular en una tinción de DAPI y utilizando un objetivo 5X (o directamente en las secciones teñidas con GFAP e Iba-1 en el caso de la inmunohistoquímica). Los datos se presentan como densidad celular media (células/mm³).

La densidad de neuronas granulares maduras (número de células/mm³) se analizó aplicando un método de disector físico acoplado a microscopía confocal (Zeiss LSM710) como han descrito otros autores previamente (Llorens-Martin *et al.*, 2006). Brevemente, el disector óptico se aplicó a todas las secciones teñidas con DAPI de modo que todos los núcleos de las neuronas maduras en la capa granular fueran contados (excluyendo todos los núcleos correspondientes a eritrocitos en caso de haberlos o a neuronas inmaduras fácilmente distinguibles por sus perfiles nucleares irregulares y una cromatina altamente condensada). Los datos se presentan como densidad celular (células/mm³).

Para la cuantificación de células que expresan DCX se aplicó un método específico: de cada sección (2 ó más secciones/animal) se tomaron dos imágenes a alto aumento de distintas regiones del GD elegidas al azar. De cada imagen se cuantificó el número de células positivas para este marcador. El área de referencia es considerada un cuadrado con uno de los lados descansando en la “línea” de la SGZ. Dividiendo el número de células DCX⁺ de cada imagen entre la longitud de la “línea” subgranular multiplicada por el espesor determinado por el microscopio, se obtiene una estimación de la densidad por “unidad de SGZ”. En el caso de la cuantificación en secciones procedentes de animales de avanzada edad (13 meses), se contó el número total de células DCX⁺ por sección y se midió el área de GD para obtener el dato como n° de células/mm². En las secciones de animales Tau KO y Wt utilizadas en los estudios de implicación de la proteína tau en la neurogénesis adulta, este dato se expresó como número de células DCX⁺/sección.

Por su parte, para la estimación de porcentajes de colocalización entre distintos marcadores, se tomaron imágenes siguiendo la misma metodología empleada para la cuantificación de células DCX⁺. De cada imagen se contó un número similar de células

positivas para DCX (número arbitrario) de modo que los porcentajes de colocalización se calcularon tomando como referencia el número total de estas células.

2.3.3.1 Estudio del patrón de distribución de las células DCX⁺ en la capa granular

Para el estudio del patrón de distribución del marcador DCX se tomaron 2 imágenes (por sección y animal) de inmunofluorescencia con un objetivo 40X (con el fin de recoger el GD en su extensión total) en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). En ellas, la capa granular fue dividida en cuatro regiones o zonas de 14,47 μ m de anchura (aproximadamente el tamaño del soma de una célula DCX⁺), siendo la zona 1 la más adyacente a la SGZ y la zona 4 la más alejada de esta (incluye a todas aquellas células que se localizan más allá de la zona 3). En cada zona, se cuantificó el número de células DCX⁺. Los datos vienen dados como número de células por zona y por sección o, en el caso concreto del estudio del papel de la proteína tau en la neurogénesis adulta, como número de células localizadas a una distancia superior a 14,47 μ m de la SGZ.

2.3.3.2 Análisis de la arborización dendrítica en células DCX⁺

Las alteraciones en la arborización dendrítica se determinaron mediante la medición de la distancia en μ m desde el soma de los precursores hasta la bifurcación de la dendrita primaria en células DCX⁺.

Tanto las mediciones del área y la longitud de la SGL, como la división en zonas de la capa granular y la cuantificación de células, fueron realizadas utilizando el programa Image J (ImageJ, v. 1.33, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

2.3.4 Medida del volumen del giro dentado

Los animales se perfundieron con 4 % PFA y los cerebros se procesaron como se describió previamente en el [apartado 2.1](#). Se llevó a cabo la tinción con tionina en cortes seriados del cerebro, es decir, cada seis secciones recogidas, se tomó una para su posterior tinción. Cada serie de secciones se dispuso sobre un portaobjetos de 52 x 75 mm previamente tratado con gelatina. Los diversos portaobjetos con las secciones adheridas a su superficie, se incubaron con tionina (Panreac) al 1 % en etanol al 90 % con ácido acético al 5 % hasta conseguir una tinción de intensidad persistente. La tionina tiñe específicamente los ácidos nucleicos. Se deshidrataron y trataron con solución Histo-clear II (National Diagnostics) para clarificar el fondo. Por último, se montaron con medio DePex (SERVA Electrophoresis GmbH). Se tomaron fotografías de los cortes en un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a cámara CCD color y se midió el área del giro dentado con ayuda del software Metamorph. El volumen del giro dentado se calculó integrando las áreas medidas con

la distancia entre cada plano sagital de las secciones.

2.4 Pruebas de comportamiento

El estudio de posibles comportamientos de tipo ansiedad-depresivos, fue llevado a cabo mediante la realización de dos test ampliamente usados con estos fines: el test de alimentación suprimida por novedad y el test de luz/oscuridad.

2.4.1 Test de alimentación suprimida por novedad.

Ratones adultos de 3 meses de edad fueron pesados y de sus jaulas se retiró toda la comida, permaneciendo disponible el agua *ad libitum*. 24 horas más tarde, los animales fueron depositados en un recinto de muros verticales opacos de dimensiones 73 x 23 x 25 cm en el que, en el centro, se puso a disposición del animal un único *pellet* de comida previamente pesado. Cada individuo fue colocado en el centro del recinto y fue grabado durante 10 minutos. El análisis de los videos permitió la determinación de distintos parámetros entre los que se encuentran: el tiempo empleado en acercarse a la comida, el tiempo total que el animal se encuentra comiendo y el total de comida consumida. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 13:00 y las 18:00 h.

2.4.2 Test de luz/oscuridad

Esta prueba fue realizada utilizando el equipamiento y el software proporcionados por *Med Associates Inc*. Brevemente, los animales fueron depositados durante 15 minutos en el mismo recinto utilizado para el test de alimentación suprimida por novedad, esta vez dividido en dos compartimentos; uno iluminado y otro oscuro. Durante ese tiempo los animales fueron grabados. Las grabaciones fueron posteriormente analizadas para determinar dos parámetros: el porcentaje de tiempo empleado en la zona de oscuridad así como el número de transiciones realizadas entre ambos compartimentos (*crossings*).

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS 17.0. Los gráficos representan los valores medios \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). Los datos fueron previamente sometidos a la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. En caso de datos normales se llevó a cabo una *t* -de Student para la comparación de dos grupos, o la ANOVA de una o dos vías para más de dos grupos (dos vías en caso de analizar dos factores de la muestra como son la localización dorsal-ventral y el genotipo). En el caso de datos no normales se aplicaron los test no paramétricos equivalentes a los anteriores: U de Mann Whitney para la comparación de dos grupos y Kruskal Wallis para el estudio de más de grupos. En todos los casos el nivel de significación aceptado fue de $p < 0,05$.

Para los estudios de colocación en los que la variable considerada era cualitativa fue necesaria la aplicación de un test no paramétrico específico: la Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LAS ALTERACIONES EN NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL MODELO Tet/GSK-3 β Y ESTUDIO DE LOS EFECTOS SOBRE LA MISMA DEL TRATAMIENTO CON DOXICICLINA (REVERSIÓN)

Trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio demuestran que la sobreexpresión de GSK-3 β *in vivo* produce muerte neuronal así como un aumento en la microglía reactiva en el giro dentado (GD) de ratones de tres meses de edad (Lucas *et al.*, 2001).

Con el fin de caracterizar dicha neurodegeneración en mayor profundidad, se analizaron secciones teñidas con tiónina en ratones de dos años de edad. Como se aprecia en la **figura 6**, existe una clara disminución en el tamaño del GD con la edad, que es más acusada en los animales Tet/GSK-3 β en los cuales esta estructura llega prácticamente a desaparecer. A la edad de tres meses dicha reducción no es tan apreciable, aunque ya es posible observar una disminución en el grosor de la capa granular, lugar donde tiene lugar la formación de nuevas neuronas en el adulto.

Estos resultados permitieron elaborar la hipótesis de que tal vez, la neurodegeneración tan acusada observada en los ratones transgénicos no fuera consecuencia única de un aumento en la muerte neuronal por apoptosis sino también de posibles defectos en el proceso de neurogénesis adulta.

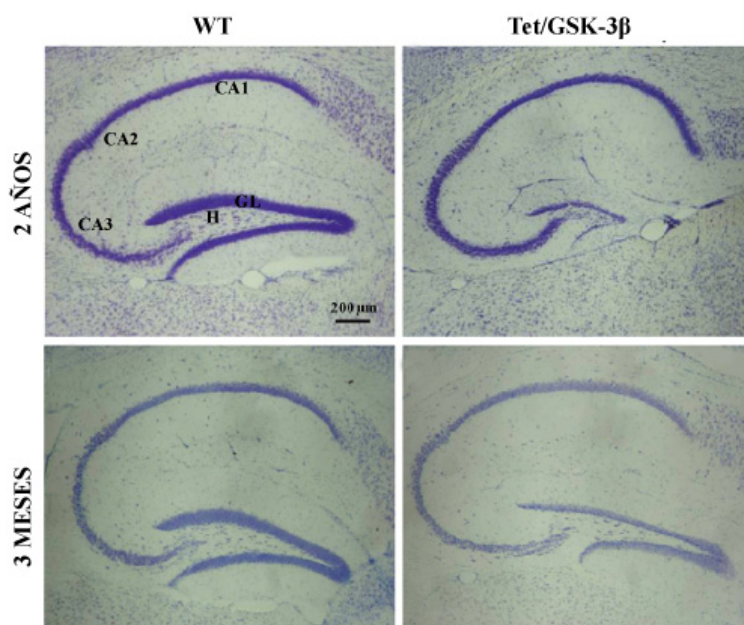


Figura 6. Atrofia del giro dentado en el ratón Tet/GSK-3 β . Secciones sagitales procedentes animales silvestres (Wt) y Tet/GSK-3 β de diferentes edades (2 años y 3 meses) teñidas con tiónina. (GL= capa granular; H= hilus; CA1,CA2 y CA3= regiones 1, 2 y 3 del asta de Ammon).

1.1 Expresión de GSK-3 β durante el proceso de neurogénesis adulta

En el modelo Tet/GSK-3 β , la expresión del transactivador (tTA) se encuentra dirigida por el promotor de la CamKII α cuya expresión es postnatal y específica del sistema nervioso central (SNC). Por este motivo, nuestro primer objetivo fue la caracterización de la expresión de GSK-3 β durante la neurogénesis adulta de la SGZ del hipocampo. Para ello, mediante técnicas de inmunofluorescencia se llevó a cabo la colocación del reportero β -galactosidasa con diferentes marcadores de las distintas etapas del proceso de neurogénesis: GFAP (progenitores más tempranos), Ki-67 (fase proliferativa), DCX (diferenciación/maduración) y NeuN (neuronas maduras postmitóticas). Esto permitió determinar que el transgen sólo se expresa a partir de la etapa de diferenciación/maduración, es decir, en el momento en que las células son positivas para (DCX) y no en la etapa de proliferación o en los precursores neuronales más tempranos (**Fig. 7**). Sin embargo, la colocación entre el marcador β -galactosidasa y DCX no parecía ocurrir en todas las células. El recuento del porcentaje de células DCX⁺ que también era positivas β -galactosidasa resultó ser de un 31,79 %, lo cual corroboró lo observado.

Con el fin de estudiar de forma más específica la expresión del transgen en los precursores neuronales, decidimos llevar a cabo un seguimiento temporal o *time-course* del reportero β -galactosidasa en los mismos. De esta manera seríamos capaces de determinar de forma más precisa el momento en el cual las células comienzan a sobreexpresar GSK-3 β . Valiéndonos de las inyecciones de los análogos de timidina correspondientes en los distintos puntos temporales (**Grupos animales 1, 5 y 6**), realizamos una inmunofluorescencia doble con los anticuerpos que reconocen IdU o CldU en función del punto temporal considerado y con el anticuerpo contra β -galactosidasa. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células positivas para ambos marcadores. Los resultados se muestran en la **figura 8**. Como se observa, la expresión del transgen empieza a apreciarse cuando las células cuentan tres semanas de edad, si bien el porcentaje de estas que lo expresa es mínimo (3,57 %). Puede considerarse que la expresión realmente es patente a las cuatro semanas, momento en el cual el 35,13 % de los precursores analizados resulta positivo para β -galactosidasa. Finalmente, a ocho semanas, dicho porcentaje se eleva al 56,75 %.

Aunque no hemos analizado puntos posteriores, suponemos que, aunque el número de células dobles aún es posible que se incremente, no todas las células granulares lleguen a expresar el reportero y por tanto a sobreexpresar GSK-3 β . Esto podría sugerir una cierta heterogeneidad en la población de neuronas granulares maduras del giro dentado de estos animales transgénicos. De hecho, no todas estas neuronas parecen ser β -galactosidasa⁺ (**Fig. 7 J, K y L**).

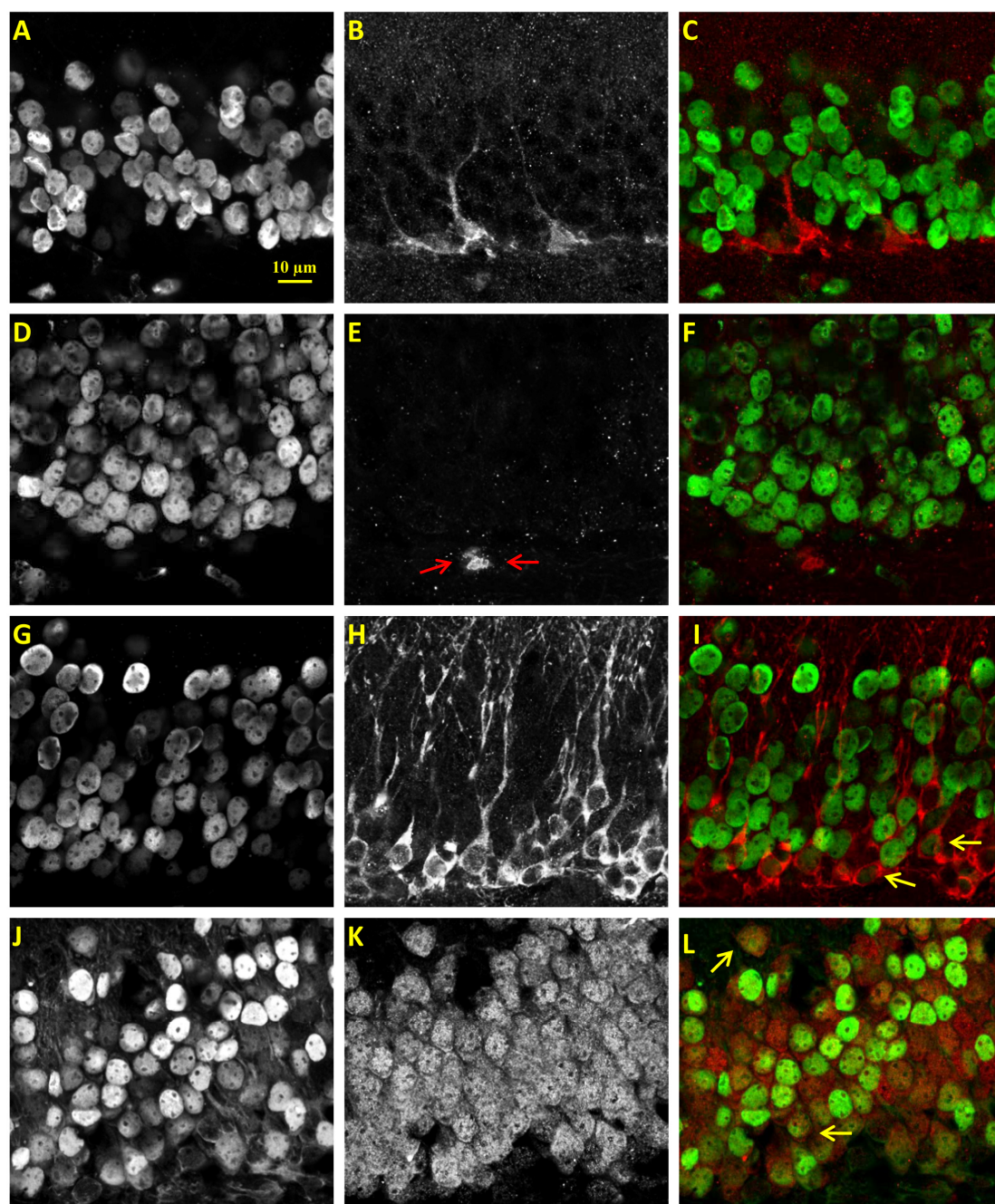


Figura 7. Expresión del transgen durante el proceso de neurogénesis adulta del hipocampo. En la columna de la izquierda (imágenes **A**, **D**, **G** y **J**) se muestra el canal verde en escala de grises correspondiente al marcaje con el anticuerpo β -galactosidasa (β -gal) en la SGZ del giro dentado dorsal de animales Tet/GSK-3 β . En la columna central se muestra el canal rojo, también en escala de grises, empleado para la visualización de la tinción con los diferentes marcadores de las distintas etapas de neurogénesis adulta: BLBP (precursores tempranos) (**B**), Ki67 (marcador de proliferación) (**E**), DCX (precursores en estadio de diferenciación/migración) (**H**) y NeuN (neuronas maduras) (**K**). Por último, la columna de la derecha recoge las imágenes resultado de la mezcla de los dos canales (rojo y verde), *merge* (**C**, **F**, **I** y **L**). Las flechas rojas indican las células positivas para Ki67 (**E**). Las flechas amarillas señalan células doble positivas para β -gal y DCX (**I**) o para β -gal y NeuN (**L**).

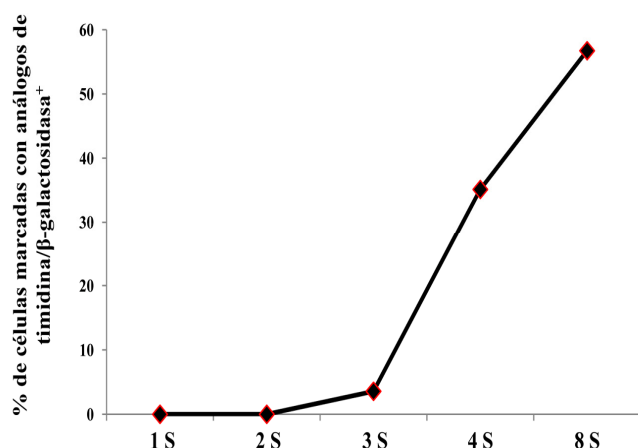


Figura 8. Time-course de expresión del transgen en los precursores neuronales (Grupos 1, 5 y 6). Representación gráfica del recuento de células precursoras de distintas edades dobles para el marcaje con los anticuerpos que reconocen los análogos de timidina IdU o CldU y con el anticuerpo que reconoce al reportero β-galactosidasa. (S=semanas post-inyección).

1.2 Estudio de las alteraciones en la diferenciación/maduración de los precursores neuronales

Debido a que la sobreexpresión de nuestra proteína parecía comenzar en el estadio de diferenciación de los precursores neuronales, nos propusimos estudiar, en primer lugar, si las células DCX⁺ presentaban algún tipo de alteración como consecuencia directa o indirecta de la sobreexpresión de GSK-3β.

1.2.1 Análisis de la densidad total de células DCX⁺; efectos de la reversión

Las primeras tinciones con el anticuerpo DCX revelaron claras diferencias entre los animales silvestres y los animales Tet/GSK-3β. Estas parecían afectar tanto al número como a la morfología de este tipo celular. Por ello, realizamos un conteo del número de células DCX⁺ en animales de dos meses y medio de edad (**Grupo 1**). Así, fue posible determinar que la sobreexpresión de GSK-3β provoca un aumento en la densidad de células positivas para dicho marcador (Wt= 26660,5 ± 2387,3; Tet/GSK-3β control= 35991,2 ± 2238,03 células DCX⁺/mm²) (**Fig. 9 A, B y D**). A continuación, nos propusimos averiguar si este fenómeno, al igual que otras alteraciones observadas en este modelo transgénico (Engel *et al.*, 2006a), era reversible tras la administración del análogo de tetraciclina, doxiciclina, que reprime la expresión del transgen gracias a su unión al transactivador (tTA). El tratamiento durante seis semanas consiguió restaurar el número de células DCX⁺ hasta cifras similares a las observadas en los individuos control (Tet/GSK-3β doxy= 23412,8 ± 2940,9 células DCX⁺/mm²) (**Fig. 9 C-D**). Sin embargo, cuando se aplicó un tratamiento más reducido (dos semanas) (**Grupo 5**), no fue posible observar dicha recuperación (Wt= 22936,9 ± 1763,3; Tet/GSK-3β control= 35991,2 ± 2238,03; Tet/GSK-3β doxy= 33422,5 ± 1332,8 células DCX⁺/mm²) (**Fig. 10**).

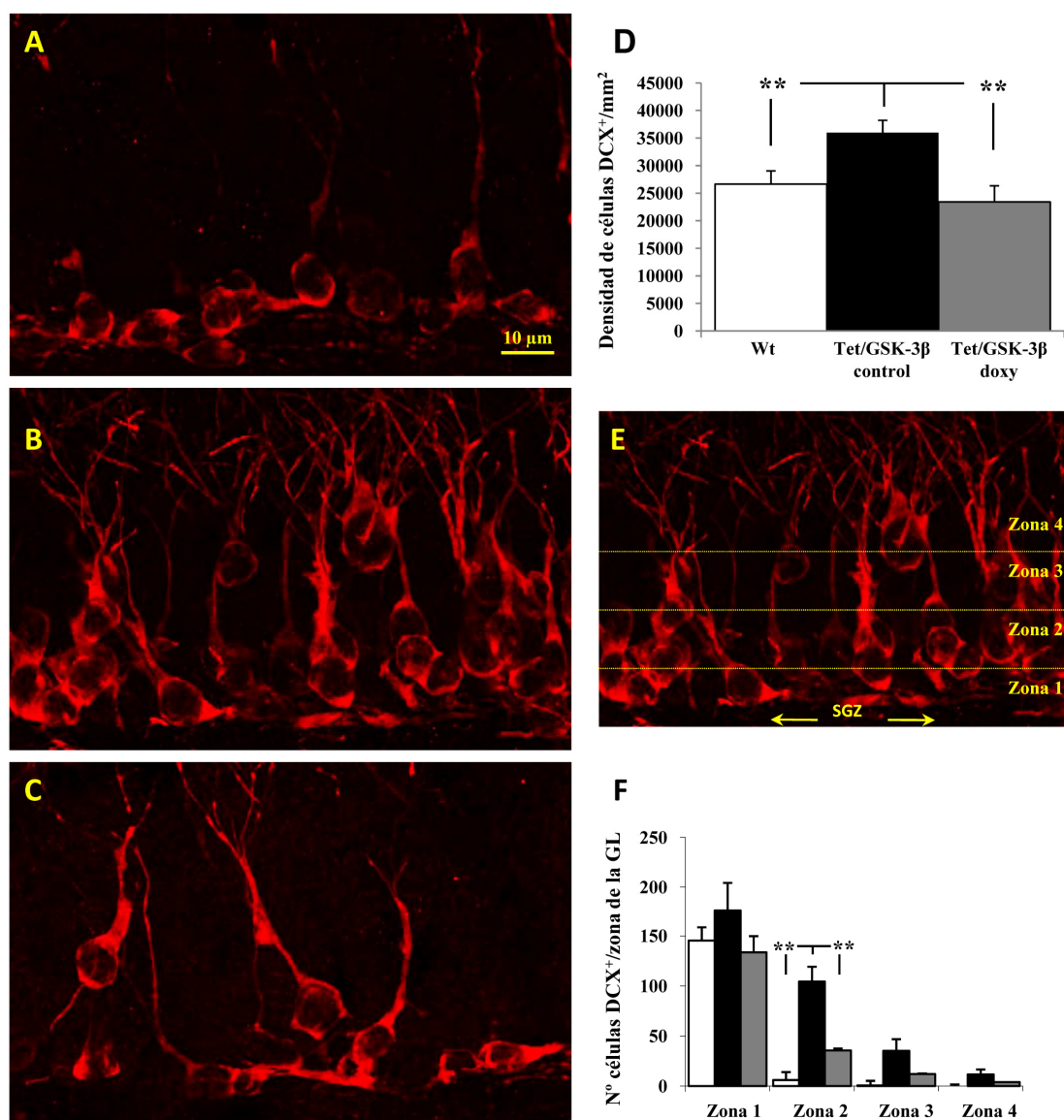


Figura 9. Alteraciones en la densidad y la localización de los precursores DCX⁺ (Grupo1). Las imágenes de la izquierda recogen una zona aleatoria de la capa granular del GD de animales silvestres (A), Tet/GSK-3β control (B) y Tet/GSK-3β doxy (C). D. Recuento de células DCX⁺ en cada uno de los grupos analizados expresado como densidad de células/mm² (ANOVA de una vía ; ** $p < 0,01$). E. La capa granular (GL) se muestra dividida en 4 zonas diferentes cada una de ellas de una anchura aproximada de 14 μm tal y como se explicó en el apartado 2.3.3.1 de Materiales y Métodos. La cuantificación de las células DCX⁺ en cada una de las zonas se resume en la gráfica de F (ANOVA de una vía ; Zona 1 $p = 0,085$; Zona 2 ** $p < 0,01$; Zona 3 $p = 0,225$; Zona 4 $p = 0,136$). Barras blancas= Wt; barras negras= Tet/GSK-3β control ; barras grises= Tet/GSK-3β doxy.

1.2.2 Patrón de localización del marcador DCX

Al analizar las secciones de los animales Tet/GSK-3β utilizadas para realizar el conteo de células DCX⁺ era posible observar que estas, no sólo eran superiores en número, sino que además se localizaban en posiciones atípicas dentro de la capa granular, en contraposición con

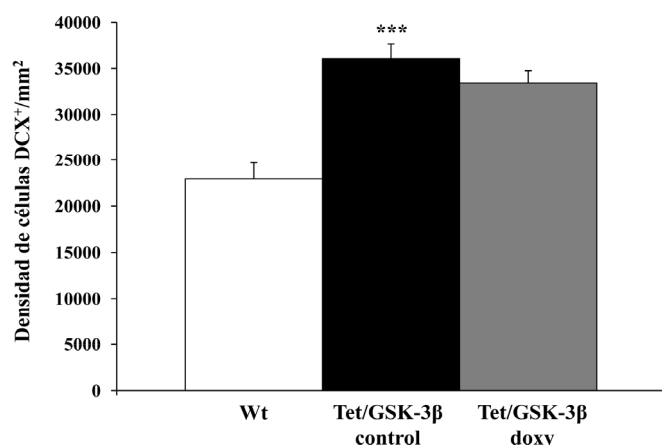


Figura 10. Densidad de células DCX⁺ tras un tratamiento de dos semanas con doxiciclina (Grupo 5). Histograma representativo del número de células DCX⁺ expresado como densidad (nº de células/mm²). (*t* de Student ; ****p* < 0,001).

lo observado en los animales silvestres, en los que estas células se disponían perfectamente orientadas y alineadas en la SGZ (Fig. 9 A-B). Para cuantificar este fenómeno, la capa granular fue dividida en cuatro regiones o zonas, tal y como quedó explicado en el apartado 2.3.3.1 de **Materiales y Métodos** (Fig.9 E). Un nuevo conteo del número de células DCX⁺ por zona, reveló que los animales Tet/GSK-3β presentan un patrón anormal de localización

de dicho marcador, al ser posible observar en ellos un mayor número de células positivas en las distintas regiones de la capa granular. Estas diferencias eran más acusadas en la zona 2, donde el aumento de estas células es estadísticamente significativo. En este caso, el tratamiento con doxiciclina durante seis semanas también recuperó el patrón normal que se observa en los animales control (estadísticamente significativo en la zona 2) (Wt= 6 ± 2 ; Tet/GSK-3β control= $104,4 \pm 14,76$; Tet/GSK-3β doxy= $35,6 \pm 8$ células DCX⁺/zona 2) (Fig. 9 C y E-F).

1.2.3 Alteraciones en la arborización dendrítica de las células DCX⁺

Cuando en animales transgénicos las células que expresan el marcador DCX se observan a gran aumento, es posible detectar alteraciones en su morfología si son comparadas con las de animales control. Así, las células tienen una morfología más heterogénea, presentando algunas de ellas dendritas apicales irregularmente orientadas. Del mismo modo, estas parecen bifurcarse en posiciones más cercanas al soma neuronal, dando a las células una apariencia arborescente característica (Fig. 11 A-B). Este fenómeno se cuantificó, para lo cual, se midió la longitud en μm desde el cuerpo neuronal hasta la bifurcación de la dendrita primaria de células DCX⁺ tanto de animales silvestres como de animales Tet/GSK-3β. Confirmando las observaciones previas, en los animales transgénicos dicha bifurcación ocurre en posiciones más cercanas al soma que en los individuos silvestres (Wt= $28,54 \pm 1,98$; Tet/GSK-3β control= $15,68 \pm 0,84 \mu\text{m}$) (Fig. 11 C).

1.2.4 Estudio del patrón temporal de expresión del marcador DCX

Teniendo en cuenta, como se comentará en el apartado 1.3.1, la ausencia de cambios en la etapa previa de proliferación y dadas las alteraciones tanto en el número como en la

morfología de los precursores DCX⁺ así como la acusada neurodegeneración que presentan estos animales, nos planteamos la posibilidad de que tales alteraciones se debieran a defectos en el proceso de maduración de estas células DCX⁺.

Nuestro primer objetivo consistió en comprobar la correcta expresión de marcadores de madurez en los precursores DCX⁺. Para ello, se llevó a cabo una inmunofluorescencia triple con los anticuerpos que reconocen a las proteínas doblecortina (DCX), calretinina (CR; marcador de neuronas inmaduras postmitóticas) y NeuN (marcador de neuronas maduras) (Fig. 12 A-D).

Tal y como se observa en la gráfica de la figura 12 E, el porcentaje de células positivas para los tres marcadores resultó ser significativamente más bajo en los individuos transgénicos (Wt= 97,4 %; Tet/GSK-3 β control= 88 %). Curiosamente, esta disminución se debía a un aumento en el porcentaje de células DCX⁺ que, aún siendo positivas para NeuN, eran negativas para CR (Fig. 12 F). Por otro lado, el tratamiento con doxiciclina restauró los porcentajes observados en ambos casos (Fig. 12 E-F).

Este resultado sugería la idea de un retraso en el apagado de DCX, aunque tampoco nos permitía descartar posibles problemas en etapas posteriores. Debido a las alteraciones que ya habíamos encontrado en los precursores DCX⁺ decidimos centrarnos, en primer lugar, en confirmar nuestra hipótesis inicial. Para ello, realizamos inyecciones de IdU en animales de un mes de edad y, cuatro semanas post-inyección, los individuos fueron sacrificados y procesados para su posterior análisis. Se les administró un pinchazo adicional del análogo CldU setenta y dos horas antes del sacrificio (Grupo 5). Siete días después de la inyección, momento en el cual el número de células positivas para DCX es máximo, la expresión de dicho marcador

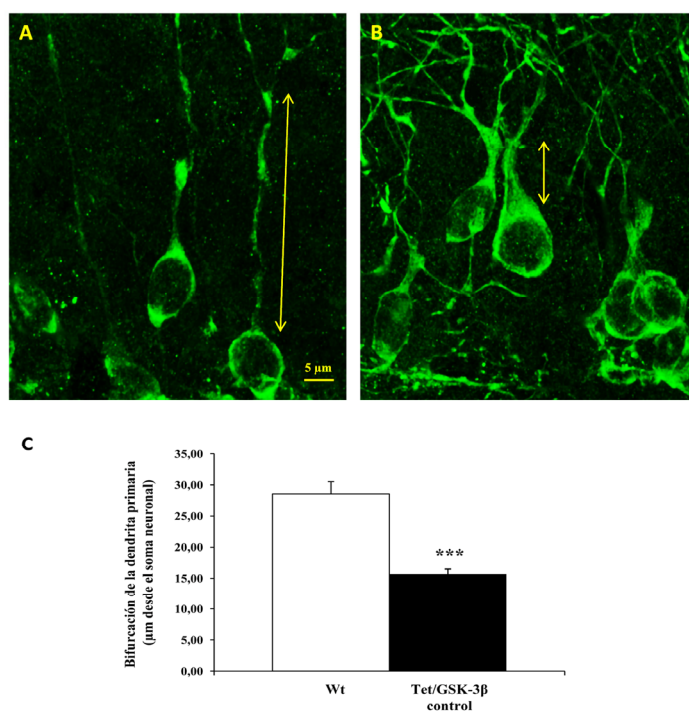


Figura 11. Alteraciones en la arborización dendrítica de los precursores DCX⁺. Inmunofluorescencia con el anticuerpo DCX en secciones sagitales de animales silvestres (A) y animales transgénicos (B). Las flechas indican la distancia del soma a la bifurcación de la dendrita primaria. Los resultados de la medición de dicha distancia se recogen en la gráfica C y vienen dados como la longitud en μm desde el soma neuronal hasta la bifurcación de la dendrita (t de Student ; *** $p < 0,001$).

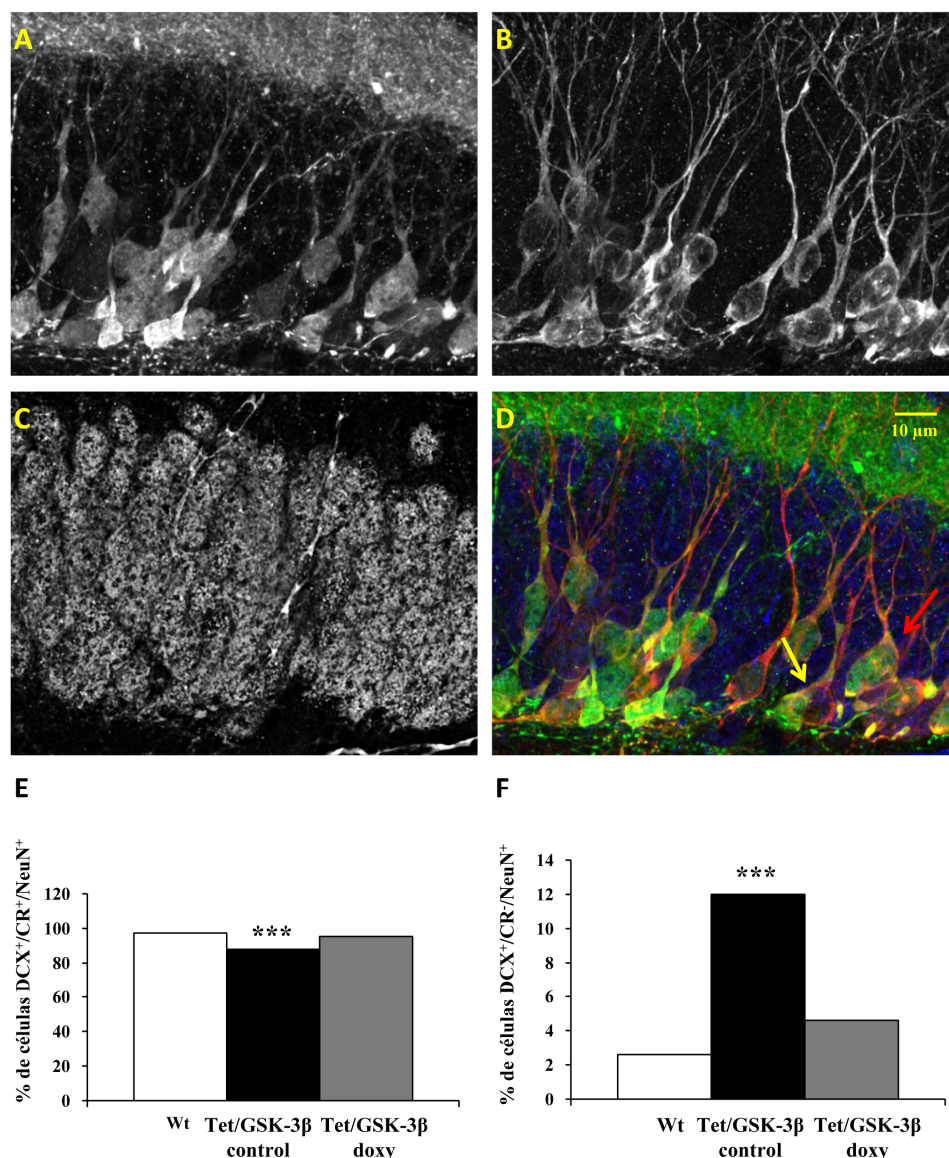


Figura 12. Expresión de marcadores de diferenciación y madurez en los precursores neuronales. Inmunofluorescencia triple con los marcadores calretinina (CR) (A), doblecortina (DCX) (B) y NeuN (C) y mezcla de los tres canales, *merge* (D). La flecha amarilla indica una célula positiva para DCX y NeuN y negativa para CR. La flecha roja señala una célula triple para los tres marcadores. E. Cuantificación del número de células positivas para DCX, CR y NeuN expresado como porcentaje respecto al total de células DCX⁺ contadas. F. Histograma representativo del número de células positivas para DCX y NeuN y negativas para CR expresado como porcentaje respecto al número total de células DCX⁺ contadas. (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 ; *** $p < 0,001$).

comienza a disminuir de modo que a las cuatro semanas post-inyección el porcentaje de estas células es mínimo, siendo prácticamente indetectable dos meses más tarde (Brown *et al.*, 2003). Por ello, en caso de que nuestros animales presentaran un retraso en el apagado de DCX, este debería ser detectado al realizar el análisis de células de cuatro semanas de edad. Para esto, se llevó a cabo una inmunofluorescencia doble con los anticuerpos que reconocen

IdU y DCX y se contó el porcentaje de células positivas para ambos marcadores. Los resultados del conteo permitieron determinar que los animales transgénicos presentaban un mayor porcentaje de células dobles (Wt= 16,91 %; Tet/GSK-3 β control= 23,84 %) (**Fig. 13**). Además, observamos que el punto de cuatro semanas analizado coincidía con la expresión del reportero β -galactosidasa y por tanto la sobreexpresión de GSK-3 β . Por otro lado, observamos que un tratamiento de dos semanas con doxiciclina, que a su vez comenzó cuando las células IdU⁺ contaban dos semanas de edad (**Grupo 5**), no consiguió revertir el porcentaje aberrante de células IdU⁺/DCX⁺ detectado en los individuos Tet/GSK-3 β (Tet/GSK-3 β doxy= 23,8 %) (**Fig. 13**).

Con el fin de profundizar en la idea del apagado del marcador DCX, quisimos analizar un punto temporal anterior a las cuatro semanas. Así, nos valimos del análogo IdU inyectado al **grupo 6** tres semanas antes de su sacrificio. Procedimos del mismo modo descrito para las células de cuatro semanas de edad y llevamos a cabo el recuento de aquellas que eran positivas para el marcaje con los anticuerpos anti-IdU y anti-DCX. Al analizar los resultados pudimos comprobar que, tres semanas después de la inyección, no era posible apreciar diferencias significativas en el porcentaje de células dobles entre animales silvestres y animales transgénicos (**Fig.13**), demostrándose así que el retraso en el apagado de DCX comienza más tarde.

A continuación y, puesto que el patrón de expresión temporal del marcador DCX parecía estar alterado en sus etapas finales, nos preguntamos si este fenómeno era un hecho aislado o era el resultado de un comienzo

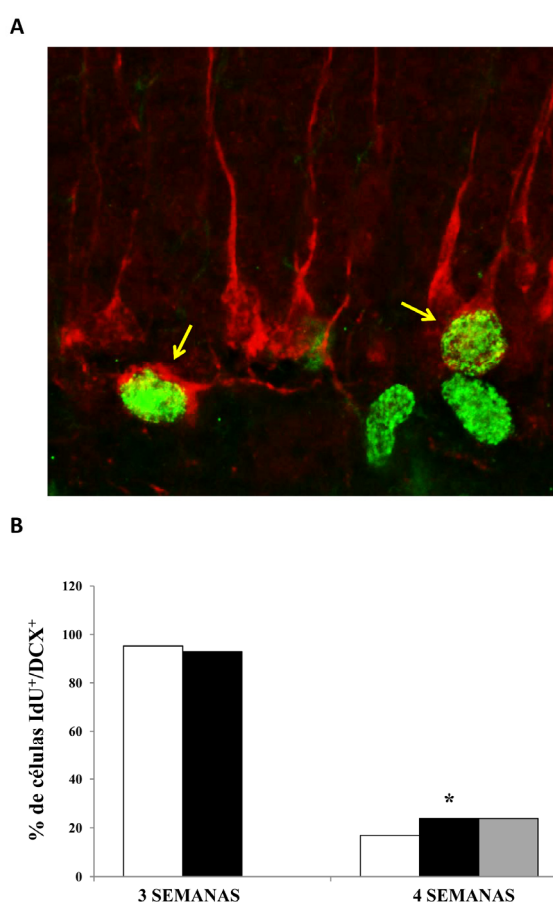


Figura 13. Expresión del marcador DCX en precursores de 3 y 4 semanas de edad (Grupos 5 y 6).

A. Inmunofluorescencia doble con los anticuerpos que reconocen IdU (verde) y DCX (rojo). Se muestra el *merge* de los dos canales. Las flechas amarillas señalan células dobles para ambos marcadores. **B.** Cuantificación del número de células positivas para IdU y para DCX expresado como porcentaje respecto al total de células IdU⁺ contadas. (Chi-cuadrado de Pearson χ^2 ; 3 semanas $p = 0,635$; 4 semanas $*p < 0,05$). (Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3 β ; barras grises= Tet/GSK-3 β doxy).

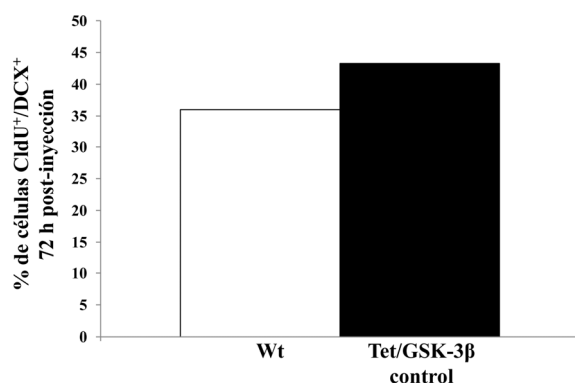


Figura 14. Expresión del marcador DCX en precursores de 72 horas de edad (Grupo 5). Cuantificación del número de células positivas para los anticuerpos CldU y doblecortina (DCX) de 72 h de edad. Los resultados se expresan como porcentaje calculado sobre el total de células CldU⁺ contadas. (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 ; $p=0,289$).

tardío también en el encendido del mismo. Por tanto, aprovechando la existencia de células precursoras de setenta y dos horas de edad en el **grupo 5**, procedimos igual que habíamos hecho con los precursores de cuatro semanas de edad y llevamos a cabo el conteo de células CldU⁺/DCX⁺ tras realizar la correspondiente inmunofluorescencia doble con los anticuerpos que reconocen estos epítomos. Puesto que la expresión de DCX ya es visible a las dos horas post-inyección (Brown *et al.*, 2003), seríamos capaces de detectar un retraso en el encendido al realizar el conteo de células dobles de setenta y dos horas de edad. Como se observa en la **figura 14**, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células dobles en los grupos analizados. Por tanto, a diferencia del apagado, el comienzo de la expresión de DCX no parecía verse afectado en los animales Tet/GSK-3β.

1.2.5 Estudio de las alteraciones en marcadores de madurez; NeuN

Al estudiar la expresión de calretinina (CR) y NeuN en los precursores DCX⁺ habíamos encontrado cambios en los porcentajes de células dobles y triples para los tres marcadores y, si bien esto apoyaba la idea de un retraso en el apagado de DCX, no permitía descartar alteraciones en la expresión de los otros marcadores. Para intentar esclarecer este punto nos centramos en analizar la expresión de NeuN en los precursores neurogénicos de cuatro semanas de edad (**Grupo 5**; precursores IdU⁺). La expresión de NeuN es detectada por primera vez diez días post-inyección y, a las cuatro semanas, ya es posible encontrar un 80 % de células que expresan este marcador (Brown *et al.*, 2003). Por ello, consideramos adecuado este punto temporal para determinar posibles alteraciones en la expresión de NeuN en nuestro modelo transgénico. Se llevó a cabo entonces una inmunofluorescencia doble con los anticuerpos IdU y NeuN y se cuantificó el número de células que eran positivas a la vez para ambos marcadores, encontrándose que los animales que sobreexpresan GSK-3β presentaban un porcentaje de células dobles significativamente más elevado (95,37 %) que los animales silvestres (85,4 %) (**Fig. 15**). Por tanto, los precursores neuronales parecían presentar alteraciones en el proceso madurativo, no sólo en lo relacionado con el marcador DCX, sino también en lo que respecta a NeuN.

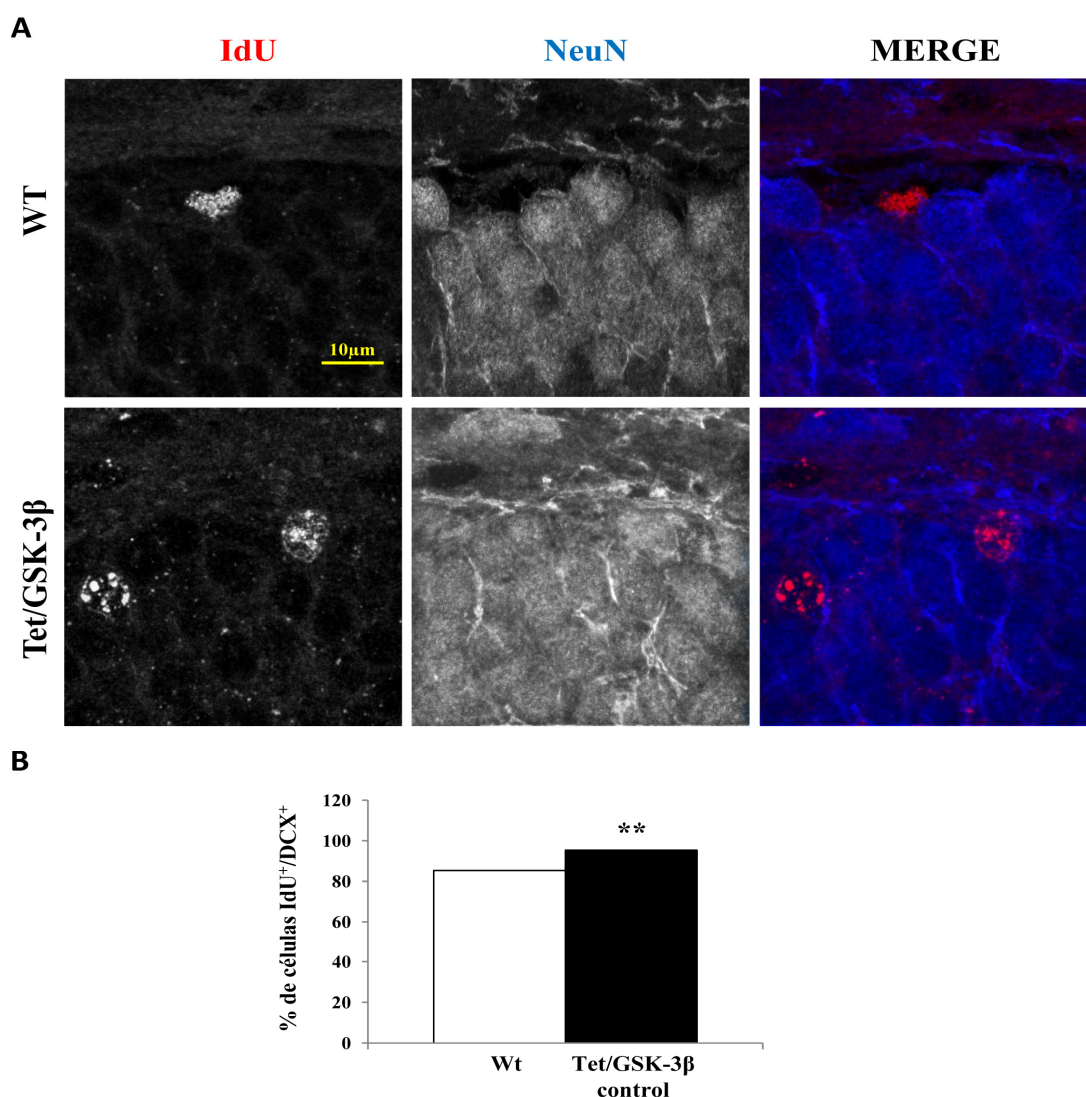


Figura 15. Expresión del marcador de madurez NeuN en precursores de 4 semanas de edad. **A.** Inmunofluorescencia doble con los anticuerpos que reconocen IdU y NeuN y la mezcla, *merge*, de los dos canales en animales silvestres (Wt) y animales transgénicos Tet/GSK-3 β . **B.** Cuantificación del número de células de 4 semanas de edad positivas para ambos marcadores. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el total de células IdU⁺ contadas (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 ; ** $p < 0,01$).

1.3 Estudio de los precursores neuronales en etapas iniciales de la neurogénesis adulta; análisis de la proliferación

1.3.1 Estudio de la proliferación de los precursores neuronales

Las alteraciones descritas en la etapa de diferenciación, especialmente en cuanto a lo que se refiere a densidad de células DCX⁺, podía hacer pensar que quizás esto se debiera a un aumento en la proliferación de los precursores. Por ello nos propusimos analizar la proliferación utilizando el anticuerpo fosfo-histona H3 (PH3), que tiñe células que se

encuentran en la fase M del ciclo celular (Hendzel *et al.*, 1997). Del mismo modo, queríamos saber si, en caso de existir alteraciones, nuevamente estas podrían ser revertidas con el tratamiento con doxiciclina. El recuento de células PH3 en secciones sagitales procedentes de animales silvestres, Tet/GSK-3 β control y Tet/GSK-3 β doxy de dos meses y medio de edad (**Grupo 1**) reveló que no existían cambios en este estadio previo al de diferenciación/ maduración neuronal (**Fig. 16**).

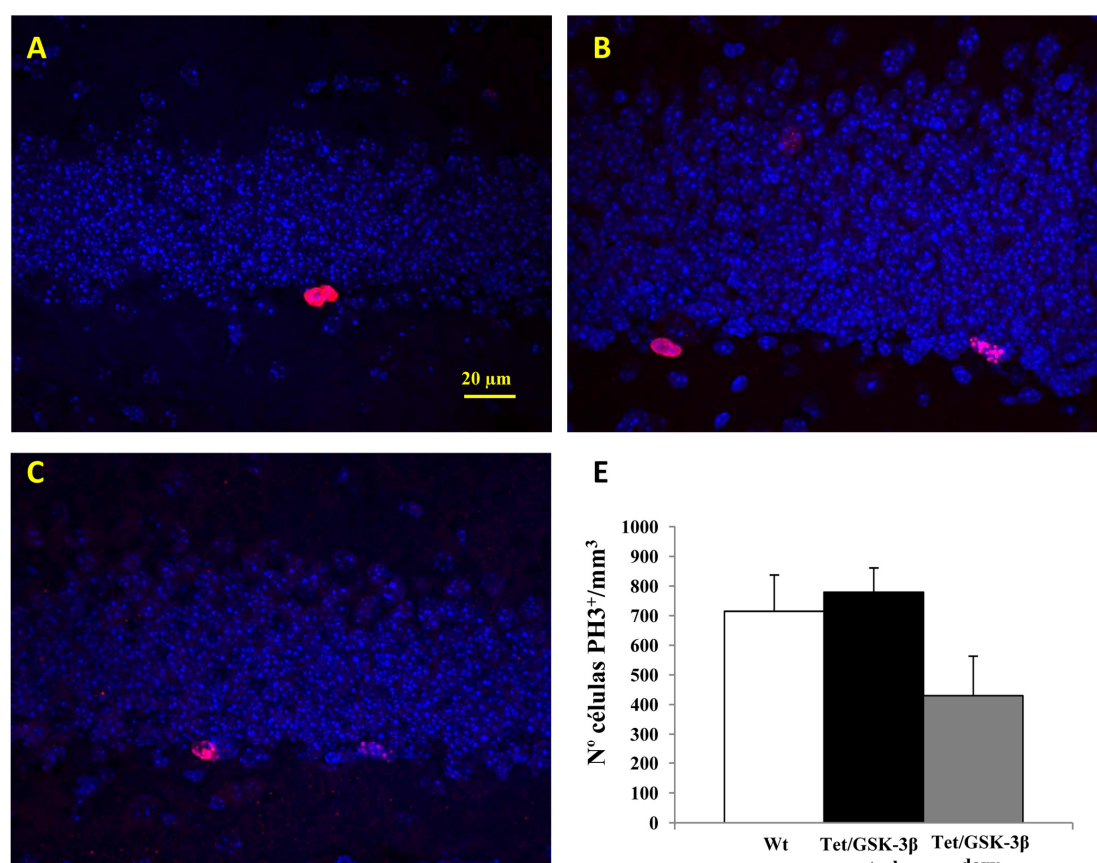


Figura 16. Análisis de la proliferación. Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-PH3 (rojo) en animales Wt (**A**), Tet/GSK-3 β control (**B**) y Tet/GSK-3 β doxy (**C**). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). **E.** Cuantificación del número de células PH3⁺ expresada como densidad (nº de células/mm³). (ANOVA de una vía; $p = 0,185$).

1.3.2 Análisis de los precursores neuronales tempranos; células nestina positivas

Como se comentó en el **apartado 1.7.1 de la Introducción**, el filamento intermedio nestina es característico de los precursores de tipo 1 y 2 que aún no han comenzado el proceso de diferenciación y maduración neuronal. Por tanto, el anticuerpo anti-nestina estaría marcando de algún modo, parte de la población considerada como el conjunto de progenitores neuronales. Ya que no habíamos detectado cambios en la etapa de proliferación, nos

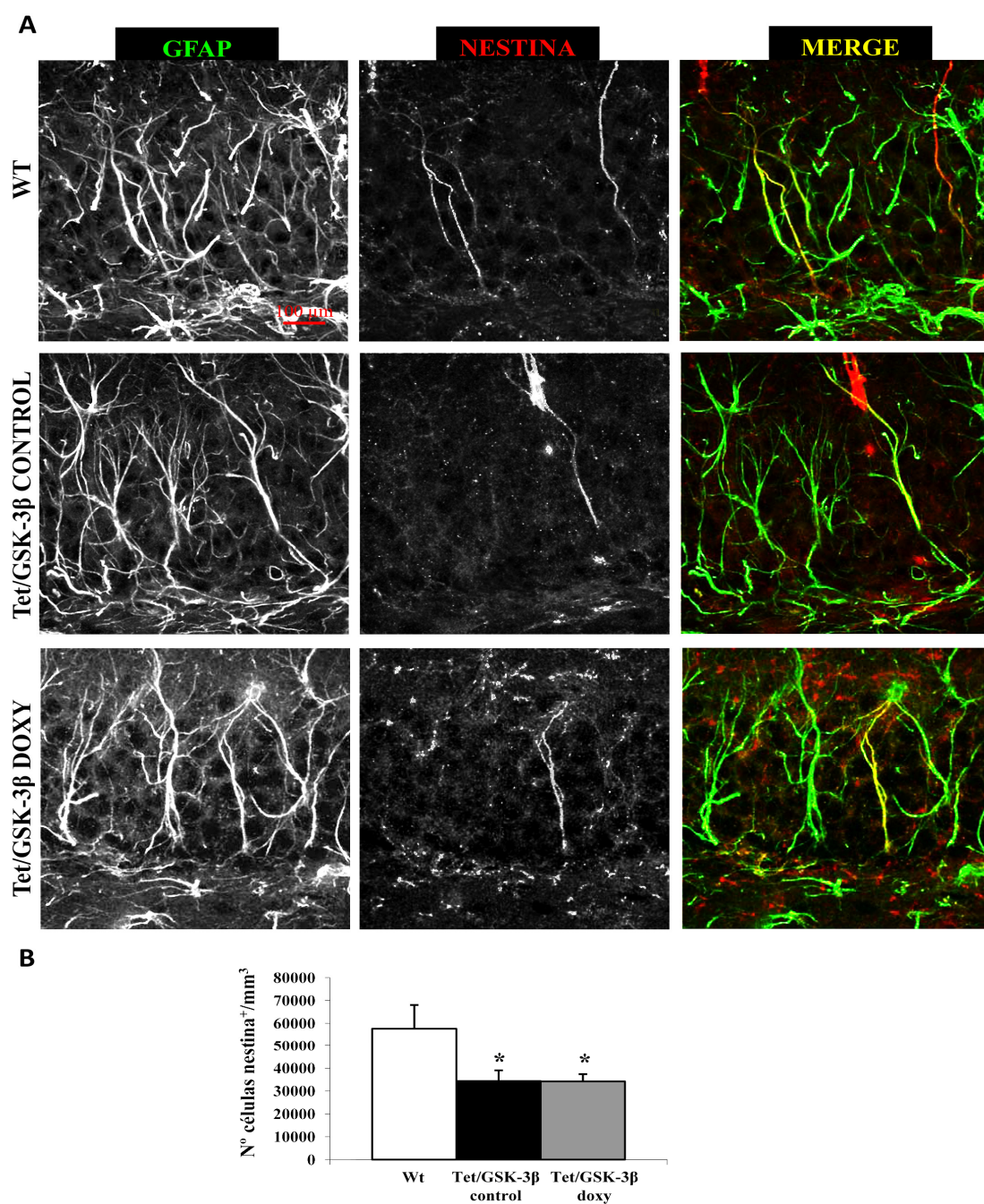


Figura 17. Estudio de los precursores neuronales tempranos. **A.** Inmunofluorescencia doble con los anticuerpos GFAP (marcador astrocítico expresado también por los precursores neuronales) y nestina y la mezcla de los dos canales, *merge*. **B.** Cuantificación del número de células nestina⁺ expresado como densidad (nº de células/mm³). (ANOVA de una vía; * $p < 0,05$).

propusimos determinar si la población de células nestina⁺ permanecería igualmente inalterada. Sorprendentemente, el análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia reveló que los individuos transgénicos mostraban una densidad de células nestina⁺ significativamente menor que los animales silvestres. Curiosamente en este caso, ni siquiera un tratamiento prolongado

con doxiciclina (Seis semanas; **Grupo 1**) era capaz de restaurar los valores normales de densidad cuantificados para los individuos Wt ($Wt = 57599,2 \pm 10443,9$; Tet/GSK-3 β control = $39654,4 \pm 6757,9$; Tet/GSK-3 β doxy = $37614,5 \pm 16997,9$ células nestina⁺/mm³) (**Fig. 17**).

Estos resultados ponen de manifiesto que, en los animales Tet/GSK-3 β , las alteraciones en neurogénesis adulta son apreciables incluso en los precursores más tempranos.

1.4 Estudio temporal de las alteraciones observadas en los animales

Tet/GSK-3 β

Hasta el momento, habíamos observado alteraciones relacionadas con los precursores DCX⁺ y la población de células nestina⁺ en animales de dos meses y medio de edad, pero desconocíamos si dichas alteraciones aparecían antes y si eran persistentes con la edad. Por ello, nos propusimos analizar individuos de un mes de edad así como de edades más avanzadas.

De forma global, cuando se compararon secciones procedentes de animales jóvenes con aquellas correspondientes a animales viejos marcadas con el anticuerpo DCX, fue posible detectar la evidente disminución del proceso de neurogénesis adulta con la edad (**Fig. 18**). Del mismo modo, una visión global del proceso en los animales transgénicos permitió detectar que, desde las edades más tempranas analizadas (un mes), hasta las edades más avanzadas (trece meses), existían alteraciones en la población de células DCX⁺.

Así, en animales de un mes de edad (**Grupo 4**), aunque las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas, en cuanto a la densidad de estas células fue posible apreciar una clara tendencia al incremento de dicha población en los animales transgénicos (**Fig. 18**). En el siguiente punto temporal analizado (Cuatro meses y medio; **Grupo 2**), el patrón encontrado fue muy similar al observado a dos meses y medio (**Grupo 1**), si bien nuevamente, el aumento en el número de células DCX⁺/mm² de los animales Tet/GSK-3 β no resultó significativo ($Wt = 20200,2 \pm 4844,6$; Tet/GSK-3 β control = $27906,97 \pm 3828,54$ células DCX⁺/mm²). Del mismo modo, estas células DCX⁺ seguían presentando un patrón anormal de localización en la capa granular, encontrándose un aumento significativo en la zona 2 ($Wt = 4,86 \pm 3$; Tet/GSK-3 β control = $36,4 \pm 3,12$ células DCX⁺/zona 2) (**Fig. 19 A**). Nuevamente el tratamiento prolongado con doxiciclina (seis semanas) tuvo un efecto sobre los parámetros analizados, existiendo una tendencia a la disminución de la densidad total de células DCX⁺ (**Fig. 18**) y una reducción significativa del número de estas células en la región 2 de la capa granular (**Fig. 19 A**). A edades más avanzadas (trece meses; **Grupo 3**), aún fue posible encontrar un incremento en el número de células DCX⁺/mm² en los animales que sobreexpresan GSK-3 β pero, curiosamente, en este caso la doxiciclina (tratamiento de cuatro semanas de duración) fue incapaz de revertir dicho fenómeno ($Wt = 624,69 \pm 138,97$;

Tet/GSK-3 β control= $4449,17 \pm 683,17$; Tet/GSK-3 β doxy= $5045,39 \pm 1143,51$ células DCX⁺/mm²) (Fig. 18).

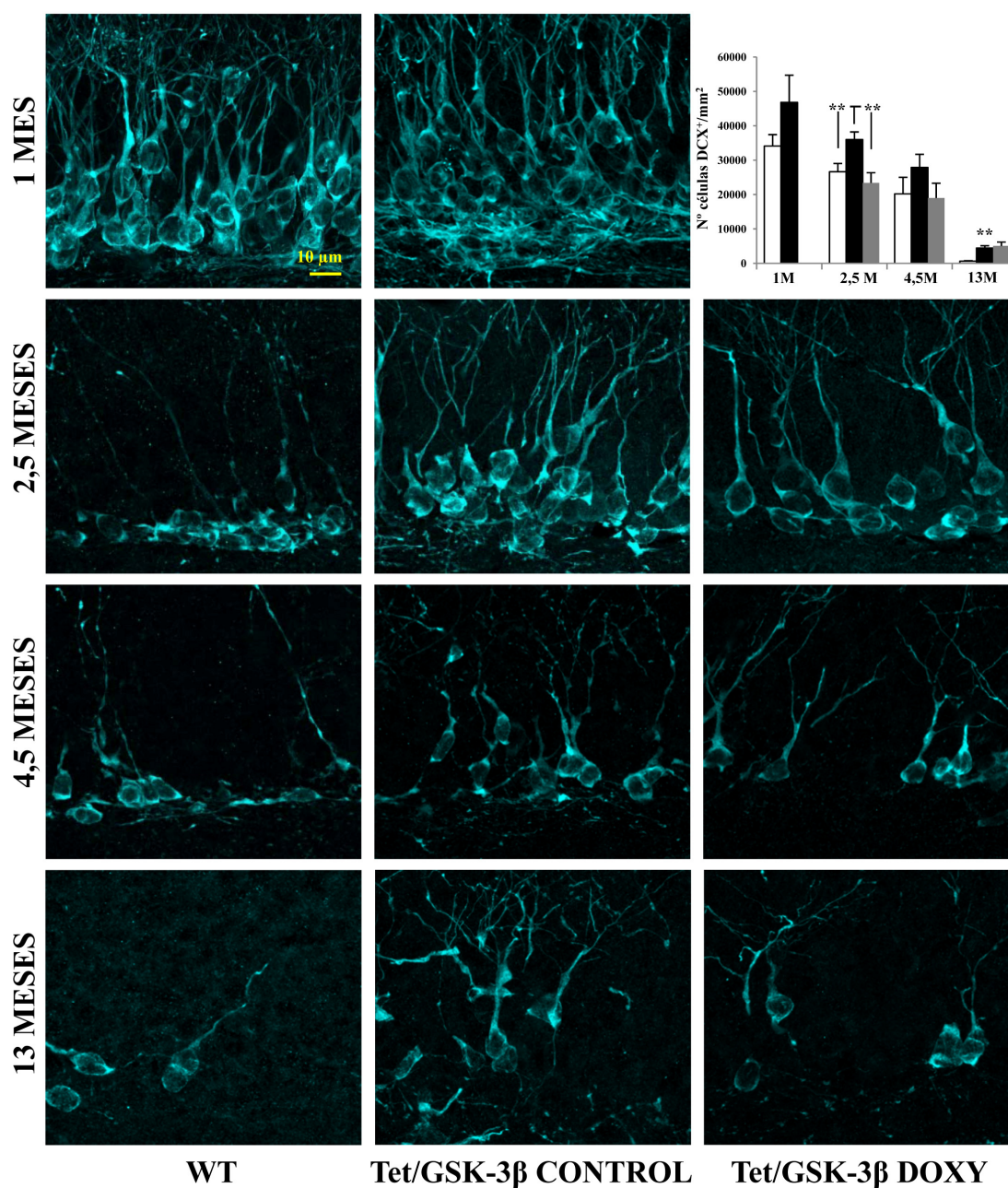


Figura 18. Patrón de expresión temporal del marcador DCX (Grupos 1, 2, 3 y 4) . Inmunofluorescencia con el anticuerpo DCX en secciones sagitales de animales Wt, Tet/GSK-3 β control y Tet/GSK-3 β doxy de diferentes edades. En la parte superior derecha se muestra la cuantificación del número de células DCX⁺ en los diferentes grupos y a las distintas edades estudiadas expresado como densidad (n° de células/mm²). (Animales de 1 mes; *t* de Student; *p*= 0,212. Resto de grupos: ANOVA de una vía ; 2,5 meses ** *p*< 0,01; 4,5 meses *p*= 0,233; 13 meses ** *p*< 0,01). Barras blancas= Wt; barras negras= Tet/GSK-3 β control ; barras grises= Tet/GSK-3 β doxy.

Puesto que habíamos observado cambios en la población de células nestina⁺ en los animales transgénicos de dos meses y medio de edad, quisimos estudiar la progresión de este cambio con la edad. Nuevamente, pudimos observar una clara disminución de los precursores con la edad. Al realizar el recuento de células positivas para este anticuerpo en los individuos de un mes de edad (**Grupo 4**), no fuimos capaces de encontrar diferencias. A cuatro meses y medio, sin embargo, encontramos una disminución significativa en los animales Tet/GSK-3 β que, nuevamente, no era reversible con el tratamiento de seis semanas con el análogo de la tetraciclina (Wt= 31788,6 \pm 5076,04; Tet/GSK-3 β control= 17926,9 \pm 1789,9; Tet/GSK-3 β doxy= 14322,7 \pm 3055,6 células nestina⁺/mm³) (**Fig. 19 B**). A edades más avanzadas fue imposible determinar la densidad de esta población celular debido al marcaje difuso proporcionado por el anticuerpo y al reducido número de células nestina⁺ presentes en estos individuos.

Por tanto, y aunque a dos meses y medio las alteraciones observadas en neurogénesis adulta en los animales que sobreexpresan GSK-3 β son más evidentes, pudimos comprobar que a edades más avanzadas aún siguen siendo patentes, aún cuando el proceso se ve prácticamente agotado como consecuencia del envejecimiento.

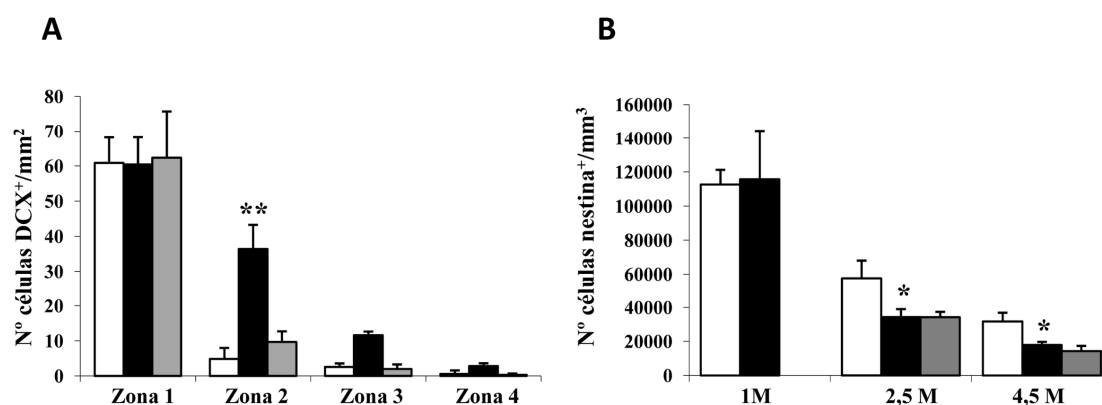


Figura 19. Patrón de localización del marcador DCX en animales de 4,5 meses de edad (Grupo 2) y análisis de precursores neuronales tempranos en animales de diversas edades (Grupos 1, 2 y 4). **A.** Cuantificación del número de células DCX⁺ en cada zona en la que fue dividida la capa granular (GL). (ANOVA de una vía ; Zona 1 $p=0,408$; Zona 2 ** $p<0,01$; Zona 3 $p=0,059$; Zona 4 $p=0,227$). **B.** Cuantificación del número de células nestina⁺ expresada como densidad (nº de células/mm³) (Animales de 1 mes; t de Student; $p=0,225$; Resto de grupos: ANOVA de una vía; 2,5 meses y 4,5 meses * $p<0,05$). Barras blancas=Wt; barras negras= Tet/GSK-3 β control ; barras grises= Tet/GSK-3 β doxy.

1.5 Alteraciones en las células microgliales

En estudios previos ya se había demostrado cómo la sobreexpresión de GSK-3 β supone una activación de células microgliales y astrocíticas como parte de un proceso

neuroinflamatorio característico de la neurodegeneración (Lucas *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2006a; Sinerol-Piquer *et al.*, 2011).

Son muchos los trabajos que sugieren que la microglía podría llevar a cabo un papel importante en el proceso de neurogénesis adulta. Esto se ha observado cuando la microglía se activa como consecuencia de un proceso inflamatorio (Ekdahl *et al.*, 2003; Monje *et al.*, 2003; Butovsky *et al.*, 2006) o cuando se induce la neurogénesis mediante enriquecimiento ambiental (Ziv *et al.*, 2006). Datos previos publicados por nuestro laboratorio en colaboración con el Instituto Cavanilles de Valencia pusieron ya de manifiesto la posible relación entre la microglía y la neurogénesis adulta en nuestro modelo transgénico (Sinerol-Piquer *et al.*, 2011).

1.5.1 Cuantificación de células microgliales (células Iba-1 positivas)

Nuestro primer objetivo, por tanto, se centró en confirmar en nuestros animales de dos meses de edad (**Grupo 1**) los cambios encontrados en la población de células microgliales y estudiar si la doxiciclina, cuya administración había conseguido revertir algunas de las alteraciones descritas en los animales Tet/GSK-3 β , era capaz también de revertir dicho

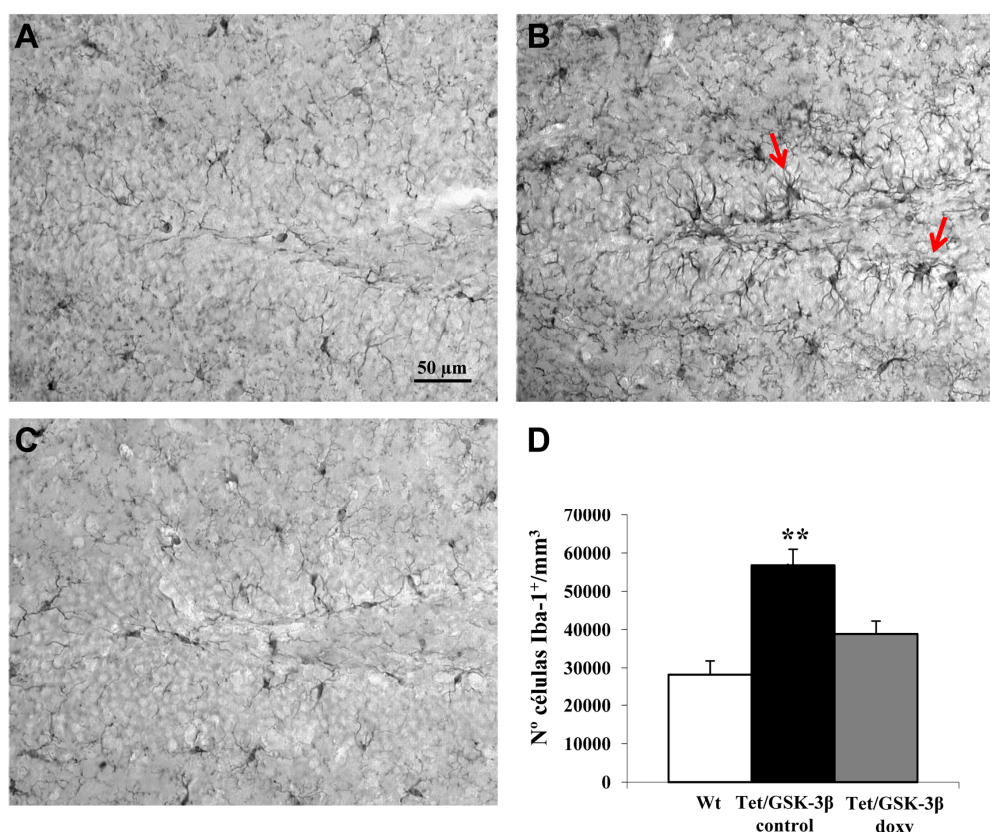


Figura 20. Análisis de células microgliales. Inmunohistoquímica con el anticuerpo Iba-1 en secciones sagitales de individuos Wt (A), Tet/GSK-3 β control (B) y Tet/GSK-3 β doxy (C). Las flechas rojas en la imagen B indican células positivas para el anticuerpo con morfología típica de células microgliales activadas. D. Cuantificación del n° de células positivas para Iba-1 expresada como densidad (n° de células/mm³). (ANOVA de una vía ; *** $p < 0,001$).

fenómeno. La cuantificación de células positivas para el marcador de microglía activada Iba-1 dio como resultado una densidad estadísticamente significativa más elevada de estas células en los individuos que sobreexpresan GSK-3 β con respecto a los controles silvestres. Los animales que habían sido tratados durante 6 semanas con el análogo de tetraciclina mostraron, por su parte, valores similares a los encontrados en los ratones silvestres (Wt= $28215 \pm 3384,3$; Tet/GSK-3 β control= $56758,6 \pm 3625,9$; Tet/GSK-3 β doxy= $38841,7 \pm 4203,9$ células Iba-1⁺/mm³) (Fig. 20).

1.5.2 Array de citoquinas

Cuando el cerebro sufre daños se produce la activación de astrocitos y microglía. Este fenómeno está acompañado de una infiltración parenquimal de linfocitos y macrófagos. Todas estas células del sistema inmune liberan entonces, como parte de la reacción inflamatoria, numerosos mediadores pro- y anti-inflamatorios, citoquinas, neurotransmisores y especies reactivas de oxígeno. Este proceso supone, por tanto, la generación y liberación de múltiples factores inflamatorios que provocan un bucle de retroalimentación positiva que resulta en efectos tanto favorables como deletéreos para la neurogénesis adulta (Das y Basu, 2008; Miller *et al.*, 2008; Whitney *et al.*, 2009).

Los datos previos obtenidos en nuestro modelo transgénico sugerían una activación microglial y astrocitaria, por lo que nos propusimos estudiar si en ellos podía estar teniendo lugar una producción anormal de citoquinas. El rastreo de sesenta y dos citoquinas en animales de dos meses y medio de edad (**Grupo 1**), incluyendo algunos factores de crecimiento y transductores de vías de señalización, permitió detectar algunas diferencias en moléculas como la fractalkina, el factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), el interferón γ (IFN- γ) y la eotaxina (también conocida como CCL11). Otras citoquinas como la interleuquina-6 (IL-6) o la 10 (IL-10) o factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) no parecían sufrir cambios en los animales Tet/GSK-3 β . Algunas de las diferencias apreciadas, como es el caso de la fractalkina, el GM-CSF y la eotaxina parecían revertir, además, con el tratamiento de seis semanas con doxiciclina (Fig. 21). (Datos suplementarios en el Anexo I).

1.6 PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los resultados encontrados en el array de citoquinas (niveles proteicos) nos llevaron a plantearnos la posibilidad de cambios en la expresión de algunos genes relacionados con los alteraciones que habíamos observado en los animales Tet/GSK-3 β ; tanto aquellas implicadas directamente en el proceso de neurogénesis adulta, como otras relacionadas con los cambios apreciados en microglía.

Como se observa en la figura 22, no encontramos alteraciones en la expresión de los

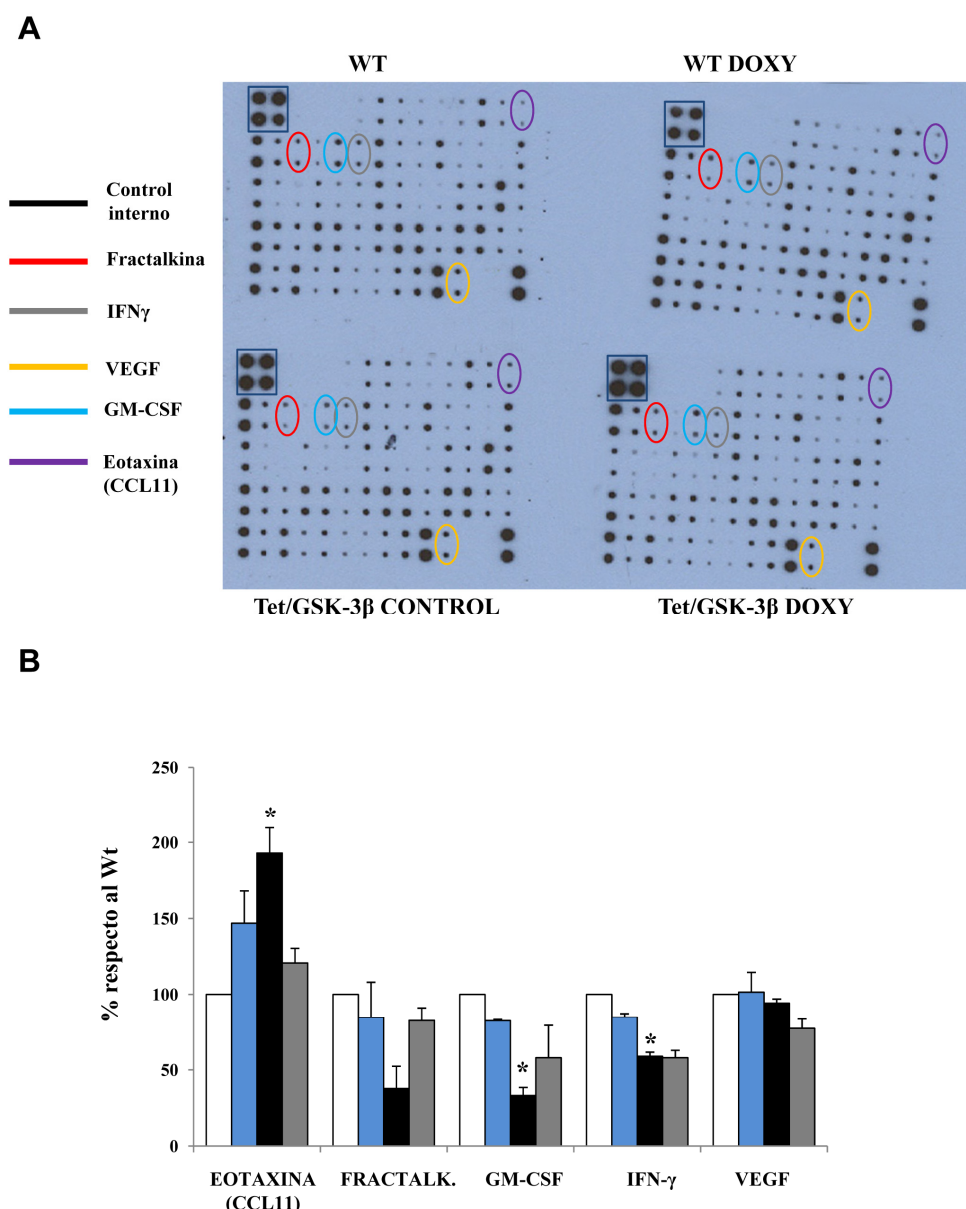


Figura 21. Resultado del ensayo de inmunodetección de citoquinas (array). **A.** Imagen de las películas resultado del revelado tras la aplicación de la solución de streptavidina acoplada a peroxidasa (HRP). En distintos colores, cuya leyenda se indica a la izquierda, se señalan algunas moléculas de interés. **B.** Representación gráfica de los niveles de las citoquinas señaladas en **A** normalizados por el control interno y expresados como porcentajes respecto los valores obtenidos para los controles Wt (asignados como 100 %). Cada valor es el resultado de la media de dos réplicas. (ANOVA de una vía ; Eotaxina $*p < 0,05$; Fractalkina $p = 0,164$; GM-CSF $*p < 0,05$; IFN- γ $**p < 0,01$; VEGF $p = 0,226$). Barras blancas= Wt ; barras azules= Wt doxy ; barras negras= Tet/GSK-3 β control ; barras grises= Tet/GSK-3 β doxy. Fractalk.= fractalkina.

genes codificantes para factores neurotróficos y/o proteínas relacionadas con las vías de señalización en las que estos participan (BDNF, VEGF, IGFBP-3, TrkB) así como tampoco detectamos cambios en genes que codifican proteínas que participan en la sinapsis (subunidades del receptor de AMPA; GLUR1, 2, 3 y 4; alteraciones en la glutamato decarboxilasa, GAD65, que cataliza el paso de glutamato a GABA o cambios en las subunidades del receptor de NMDA;

GRIN2A, 2B, 2C y 2D).

Tampoco se detectaron cambios en la expresión de los genes que codifican para algunas de las moléculas que parecían estar alteradas en el *array* de citoquinas; la fractalkina (y su receptor) y el IFN- γ . En el caso del GM-CSF, los niveles de ARN mensajero (mARN) resultaron tan bajos que ni siquiera fue posible la detección por parte de las sondas en la PCR cuantitativa.

GEN	PROTEÍNA	WT	Tet/GSK-3 β	Tet/GSK-3 β DOXY	ESTADÍSTICA
Bdnf	BDNF	100	95,3	109	$p=0,814$
Vegfa	VEGF	100	94,1	105	$p=0,582$
Igfbp 3	IGFBP-3	100	115	123	$p=0,652$
Ntrk2	TrkB	100	117	119	$p=0,359$
Gria1	GLUR1	100	93,6	98	$p=0,935$
Gria2	GLUR2	100	122	128	$p=0,243$
Gria3	GLUR3	100	100	99,9	$p=1$
Gria4	GLUR4	100	74,9	100	$p=0,579$
Gad2	GAD65	100	92,2	93,2	$p=0,733$
Grin1	GRIN1	100	84,9	108	$p=0,570$
Grin2a	GRIN2A	100	116	122	$p=0,569$
Grin2b	GRIN2B	100	129	127	$p=0,098$
Grin2c	GRIN2C	100	145	112	$p=0,3767$
Grin2d	GRIN2D	100	114	114	$p=0,759$
Ifng	IFN- γ	100	87,2	111	$p=0,493$
Cx3cl1	FRACTALKINA	100	74,1	86	$p=0,268$
Cx3cr1	RECEPTOR FRACTALKINA	100	66,8	75,6	$p=0,273$

Figura 22. Resultado de la cuantificación de los niveles de mARN mediante PCR cuantitativa (RT-PCR). En la tabla se indican los genes y el nombre de la proteína que codifican. Los niveles de cada gen vienen expresados como porcentajes respecto al valor de los individuos silvestres considerado como el 100 %. Se adjuntan también los p -valores resultado de la ANOVA de una vía, exceptuando los casos de Grin1 y Grin2a en los que se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

2. HIPOCAMPO DORSAL *VERSUS* VENTRAL; DIFERENCIAS BIOQUÍMICAS Y CELULARES

2.1 Niveles de GSK-3 β en el giro dentado del hipocampo dorsal *versus* ventral

Debido a las notables diferencias entre las regiones dorsales y ventrales tanto anatómicas como funcionales (Fanselow y Dong, 2010), nos preguntamos si esto quedaría reflejado también en los niveles y grado de actividad de nuestra proteína de interés, GSK-3 β . Por ello, en primer lugar analizamos la expresión de la proteína mediante *Western blot* en extractos hipocámpales de ratones silvestres de dos meses de edad. Se utilizaron tanto el anticuerpo que reconoce la forma inactiva de GSK-3 β (fosforilada en la serina 9), como el que reconoce a la proteína de manera total y de forma independiente a su estado de fosforilación. Al comparar la proporción “forma fosforilada/forma total” entre las regiones dorsal y ventral se encontró que esta era significativamente más elevada en la zona ventral sugiriendo una mayor inactividad de la enzima en dicha región (**Fig. 23**). Nos propusimos entonces analizar el estado de fosforilación de Akt, la principal quinasa implicada en la fosforilación de GSK-3 β (Cross *et al.*, 1994; Cross *et al.*, 1995). Nuevamente se llevó a cabo la detección con un anticuerpo contra la forma fosforilada de la proteína en la serina 473 y la forma total, y se calculó la proporción entre ambas. Concordando con lo encontrado en lo referente a GSK-3 β , dicha proporción resultó ser significativamente más elevada en la región ventral de los individuos silvestres, reflejando una mayor actividad de la quinasa en esta región (**Fig. 23**).

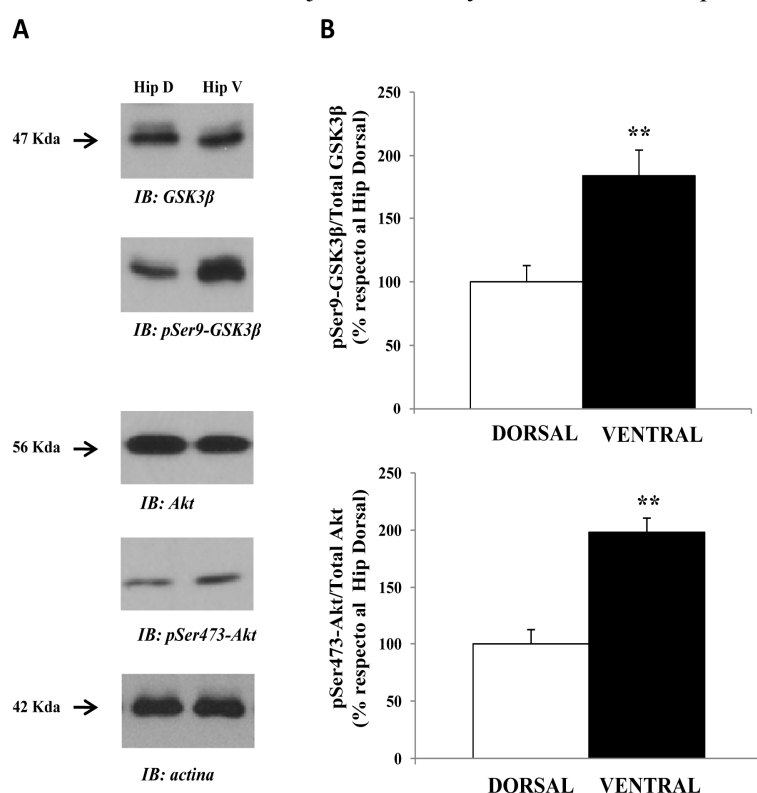


Figura 23. Resultado de los análisis de inmunodetección (*Western Blot*) de las proteínas GSK-3 β y Akt en el hipocampo dorsal y ventral de animales silvestres. **A.** *Western blot* de GSK-3 β , la forma fosforilada de GSK-3 (pSer9-GSK-3 β), Akt, la isoforma fosforilada de Akt (pSer473-Akt) y actina en homogenados de hipocampo dorsal y ventral de animales silvestres. **B.** Histogramas representativos de los niveles de pGSK-3 β /GSK-3 β total y pAkt/Akt total todos ellos expresados como porcentajes respecto al hipocampo dorsal (*t* de Student ***p* < 0,01). Barras blancas = Wt; barras negras = Tet/GSK-3 β .

Una vez que comprobamos que las diferencias entre el hipocampo dorsal y el ventral también parecían ser patentes en cuanto a lo que a la proteína GSK-3 β se refiere, nuestro interés se centró en analizar si tales diferencias eran apreciables también en nuestro modelo transgénico. En primer lugar comprobamos si los niveles de expresión de la proteína eran similares en ambas regiones. Para ello, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Myc (epítipo unido a la región N-terminal de la GSK-3 β transgénica) en secciones sagitales de tejido en las que era posible apreciar las zonas dorsal y ventral del hipocampo de forma separada. El análisis reveló un intenso marcaje de las neuronas granulares del giro dentado (Fig. 24 A). La cuantificación de células Myc positivas en el GD dorsal y ventral mostró una

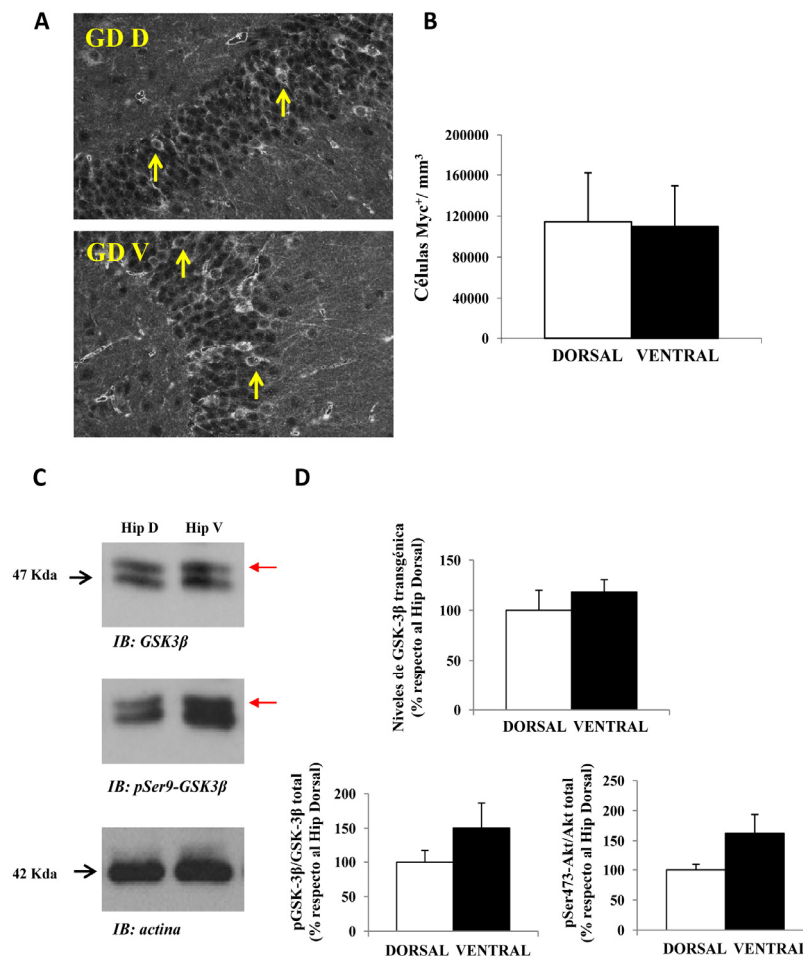


Figura 24. Patrón de expresión del transgen en los ratones Tet/GSK-3 β . **A.** Inmunofluorescencia en el giro dentado (GD) dorsal (D) y ventral (V) de animales transgénicos con el anticuerpo que detecta el epítipo Myc de la GSK-3 β transgénica. Las flechas señalan células positivas para el marcaje. **B.** Cuantificación del número de células Myc⁺ en el GD D y el GD V de los ratones que sobreexpresan GSK-3 β expresado como densidad (nº de células/mm³). **C.** Western blot en extractos de hipocampo dorsal y ventral de animales Tet/GSK-3 β con el anticuerpo anti-GSK-3 β que reconoce tanto la forma endógena como la transgénica y el anticuerpo anti pSer9-GSK-3 β . Las flechas indican la forma transgénica de la proteína. **D.** Histogramas representativos de los niveles de GSK-3 β transgénica y de las relaciones pSer9-GSK-3 β /GSK-3 β total y pSer473-Akt/Akt total todos ellos expresados como porcentajes respecto al hipocampo dorsal (*t* de Student; niveles de GSK-3 β transgénica *p* = 0,439 ; relación pSer9-GSK-3 β /GSK-3 β total *p* = 0,232; relación pSer473-Akt/Akt *p* = 0,095). Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3 β .

densidad similar en ambas regiones (**Fig. 24 B**). Para apoyar este resultado se analizaron mediante *Western blot*, extractos de hipocampo de las regiones dorsal y ventral de los ratones Tet/GSK-3 β con el anticuerpo anti-GSK-3 β . El densitometrado de la banda transgénica, de un peso algo mayor que la correspondiente a la forma endógena de la proteína debido al epítipo Myc unido al extremo N-terminal, dio como resultado niveles similares en las dos regiones (**Fig. 24 C-D**).

Una vez comprobado que el transgen parecía estar expresándose de manera similar en el hipocampo dorsal y ventral, quisimos determinar si GSK-3 β , al igual que en los individuos silvestres, se encontraba más inactiva en la zona ventral. Para ello, nuevamente se llevó a cabo un análisis mediante *Western blot* con los mismos anticuerpos utilizados anteriormente. La proporción entre la forma fosforilada y la forma total de GSK-3 β , si bien no mostró diferencias significativas, permitió detectar una clara tendencia al aumento en la zona ventral (**Fig. 24 C y D**). De forma similar, se encontró una proporción mayor, aunque de nuevo no significativa, de la forma fosforilada respecto a la total de la quinasa Akt (**Fig. 24 D**).

2.2 Neurodegeneración diferencial en las regiones dorsal y ventral

Previamente ya habíamos descrito que los individuos Tet/GSK-3 β muestran una clara atrofia del GD con la edad. Sin embargo, estos estudios se habían llevado a cabo cuantificando el GD al completo, sin analizar el hipocampo de forma regional (Engel *et al.*, 2006b). Por ello,

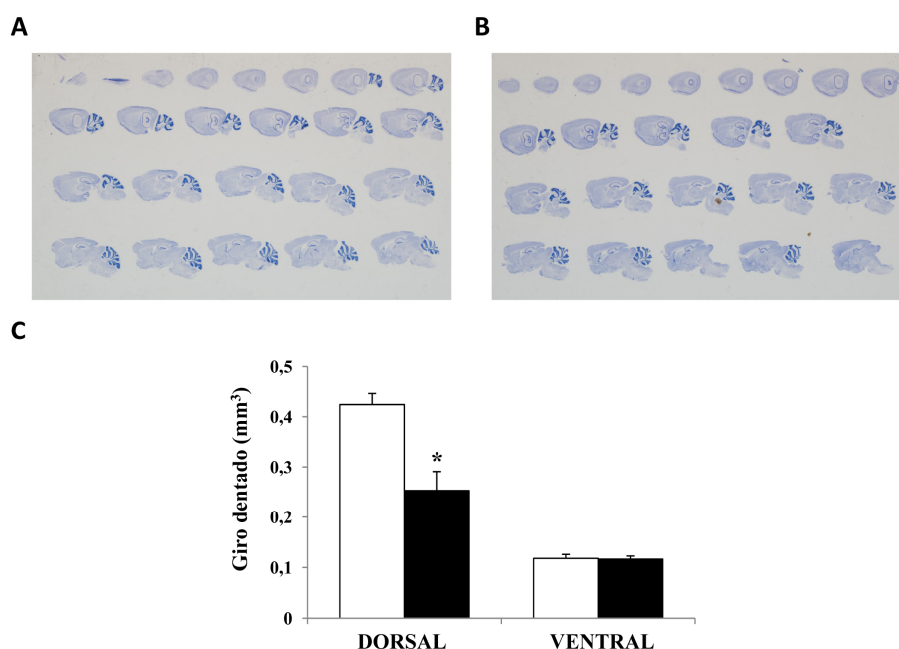


Figura 25. Volumen del GD dorsal y ventral en animales envejecidos de 2 años de edad. Secciones sagitales teñidas con tiónina procedentes de animales silvestres (**A**) y animales Tet/GSK-3 β (**B**) utilizadas para la medición volumétrica del GD. **C**. Representación gráfica de la medición del volumen del GD dorsal y ventral en los dos grupos analizados. (ANOVA de dos vías; * $p < 0,05$). Barras blancas = Wt ; barras negras = Tet/GSK-3 β .

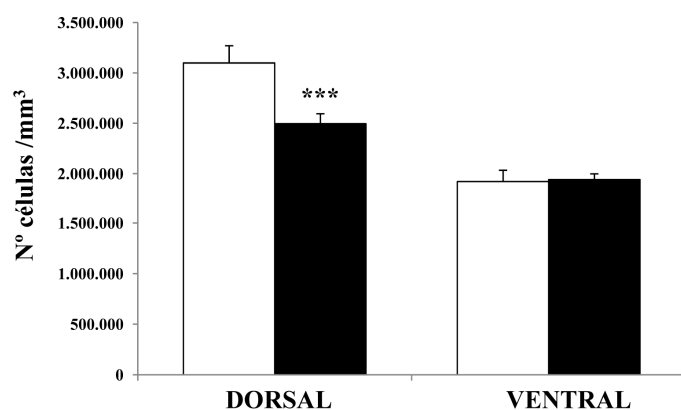


Figura 26. Densidad celular en la capa granular. Histograma representativo del número de células maduras contadas en la capa granular del GD expresado como densidad (nº de células/mm³). (ANOVA de dos vías; *** $p < 0,001$). Barras blancas= Wt ; barras negras = Tet/GSK-3β.

nos propusimos repetir la medición esta vez teniendo en cuenta las regiones dorsal y ventral del hipocampo por separado. El estudio de secciones teñidas con tionina de individuos transgénicos de 2 años reveló una disminución del GD dorsal del $40.4 \pm 7.06\%$ con respecto a animales control. Por su parte, el volumen del GD ventral permaneció prácticamente inalterado (disminución del $1.02 \pm$

2.96%) (Fig. 25).

En base a estos resultados, quisimos comprobar si dicha atrofia pudiera deberse a una pérdida selectiva de neuronas granulares. Utilizando un método de disector físico acoplado a microscopía confocal (Llorens-Martin *et al.*, 2006) en secciones procedentes de animales de 2 meses de edad, fuimos capaces de determinar una reducción significativa de la densidad de este tipo neuronal en la región dorsal ($19.5 \pm 0.4 \%$) que no fue detectada en el GD ventral (Fig. 26).

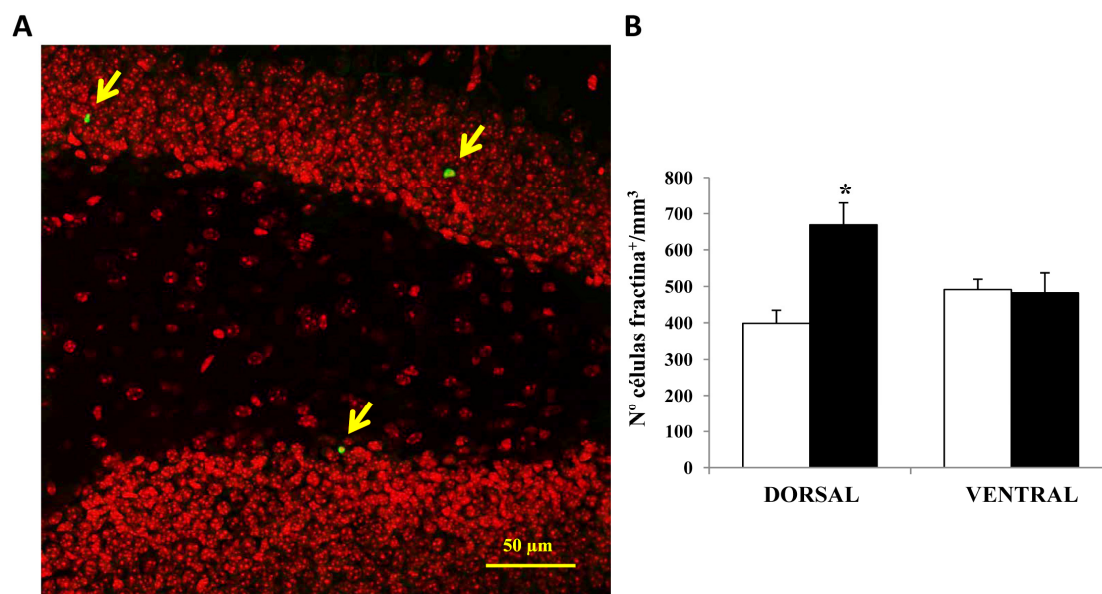


Figura 27. Muerte neuronal en el ratón Tet/GSK-3β. **A.** Imagen representativa de la tinción con el anticuerpo anti-fractina en una sección sagital de un individuo transgénico. Las células positivas se indican con flechas. Los núcleos neuronales aparecen en rojo teñidos con DAPI. **B.** Cuantificación del número de células fractina⁺ expresada como densidad (nº de células/mm³). (ANOVA de dos vías; * $p < 0,05$). Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3β.

2.3 Análisis de la muerte en el giro dentado dorsal *versus* ventral

Como se describió en la caracterización inicial del modelo, la sobreexpresión de GSK-3 β produce un aumento de la muerte neuronal por apoptosis (Lucas *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta esto, nos preguntamos si se estaría produciendo una muerte neuronal regional diferencial como consecuencia de dicha sobreexpresión. Para abordar esta cuestión realizamos una tinción con el anticuerpo anti-fractina (la fractina es un fragmento de la proteína actina liberado por acción de la caspasa-3 que es detectado en células que están sufriendo muerte celular por apoptosis). De acuerdo con los resultados previos, encontramos un incremento significativo en la densidad de células fractina⁺ en el GD dorsal (incremento del 168 ± 30 %) (Fig. 27), mientras que en el GD ventral este parámetro no presentó diferencias.

2.4 Estudio de la neuroinflamación en las regiones dorsal y ventral hipocampales

La muerte neuronal generalmente se encuentra acompañada por un fenómeno de astrogliosis que es considerada como marca histopatológica del proceso neurodegenerativo. Aunque previamente nuestro grupo ya publicó un aumento de astrocitos reactivos en los

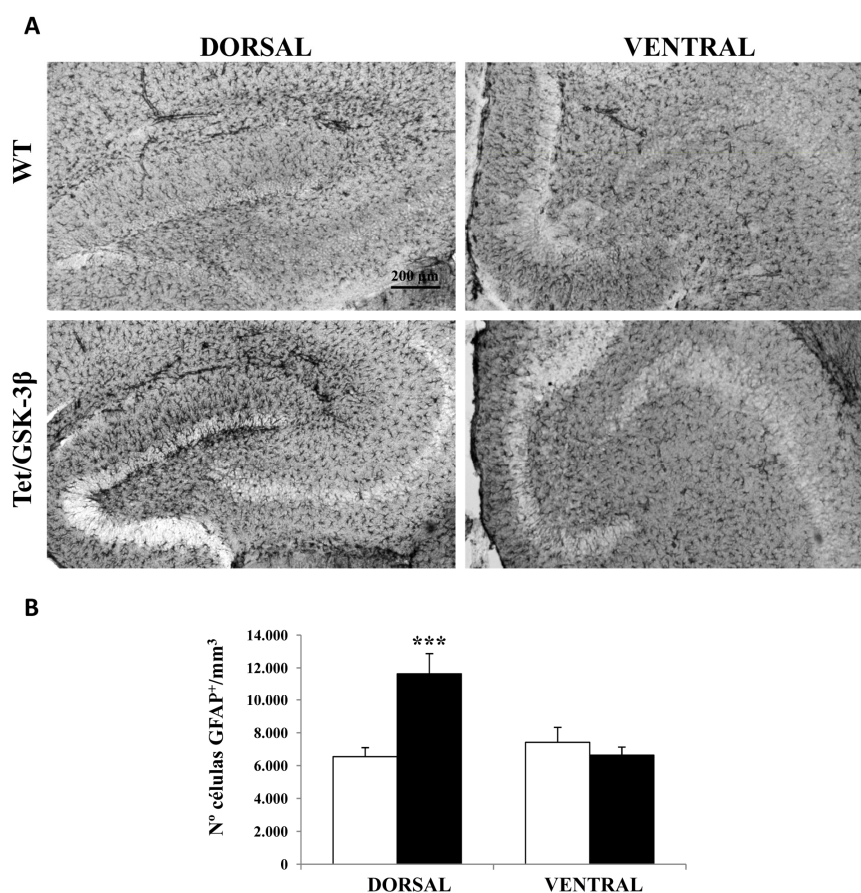


Figura 28. Astrocitosis reactiva en el GD dorsal *versus* ventral. **A.** Inmunohistoquímica en secciones sagitales de animales Wt y Tet/GSK-3 β utilizando el anticuerpo anti-GFAP. **B.** Cuantificación del número de células GFAP⁺ expresada como densidad (n° de células/mm³). (ANOVA de dos vías; *** p < 0,001). Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3 β .

los animales que sobreexpresan GSK-3 β (Engel *et al.*, 2006a), nuevamente este dato consideraba al hipocampo como una estructura única. Por ello, y considerando los datos obtenidos sobre muerte neuronal específica en la capa granular del GD dorsal, quisimos averiguar si la astrogliosis también ocurría de forma diferencial en las regiones dorsal y ventral. Gracias a la tinción inmunohistoquímica con el marcador GFAP, y, teniendo en cuenta las características morfológicas de los astrocitos reactivos (Ridet *et al.*, 1997), fuimos capaces de determinar un aumento significativo en el número de estas células/mm³ únicamente en el GD dorsal y no en el ventral (Fig. 28).

En su conjunto, estos datos apuntan a que el proceso neurodegenerativo en los animales Tet/GSK-3 β parece ocurrir principalmente en el hipocampo dorsal.

2.5 Alteraciones en el comportamiento derivados de la sobreexpresión de GSK-3 β

Previamente, nuestro laboratorio ya había demostrado que un aumento en la actividad de la quinasas GSK-3 β era suficiente para inducir déficits en el aprendizaje espacial medidos gracias al test de Morris Water Maze (Hernandez *et al.*, 2002). Estas alteraciones también se hicieron patentes en el test de reconocimiento de objetos (Engel *et al.*, 2006a). Dichos

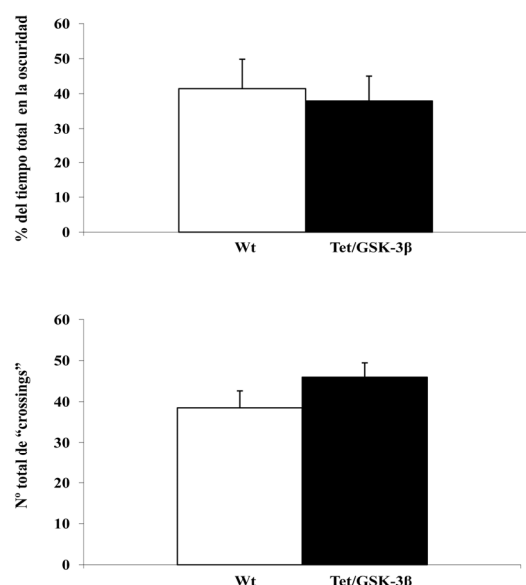


Figura 29. Test de luz-oscuridad en animales de 3 meses de edad. Histogramas representativos de los parámetros analizados: “Tiempo en la oscuridad”, expresado como porcentaje respecto al tiempo total y “Número de crossings o cruces entre la zona oscura y la zona iluminada”. (*t* de Student; “% de tiempo empleado en la oscuridad” $p=0,193$; “Número de crossings” $p=0,445$). Barras blancas = Wt ; barras negras = Tet/GSK-3 β .

resultados confirmaban por tanto, que las funciones relacionadas directamente con la región dorsal hipocampal estaban alteradas en el modelo Tet/GSK-3 β . Para evaluar si la sobreexpresión de GSK-3 β estaría o no afectando también a las funciones que se consideran relacionadas con el hipocampo ventral, se llevaron a cabo dos test que evalúan los comportamientos de tipo ansiedad: el test de luz/oscuridad y el test de alimentación suprimida por novedad. En el primero, los animales no mostraron diferencias en los dos parámetros analizados con respecto a sus controles: número total de cruces entre la zona iluminada y la oscura, crossings, y tiempo de permanencia en el compartimento oscuro (Fig. 29). Resultados similares se obtuvieron en el test de alimentación suprimida por novedad, en el

que ni el tiempo de latencia hasta el acercamiento a la comida, ni la cantidad de comida consumida presentaron diferencias entre los grupos analizados sugiriendo una ausencia de alteraciones en el componente emocional y de motivación. Del mismo modo, la pérdida de peso como consecuencia de la restricción calórica se produjo de forma similar en los individuos transgénicos y los silvestres (Fig. 30).

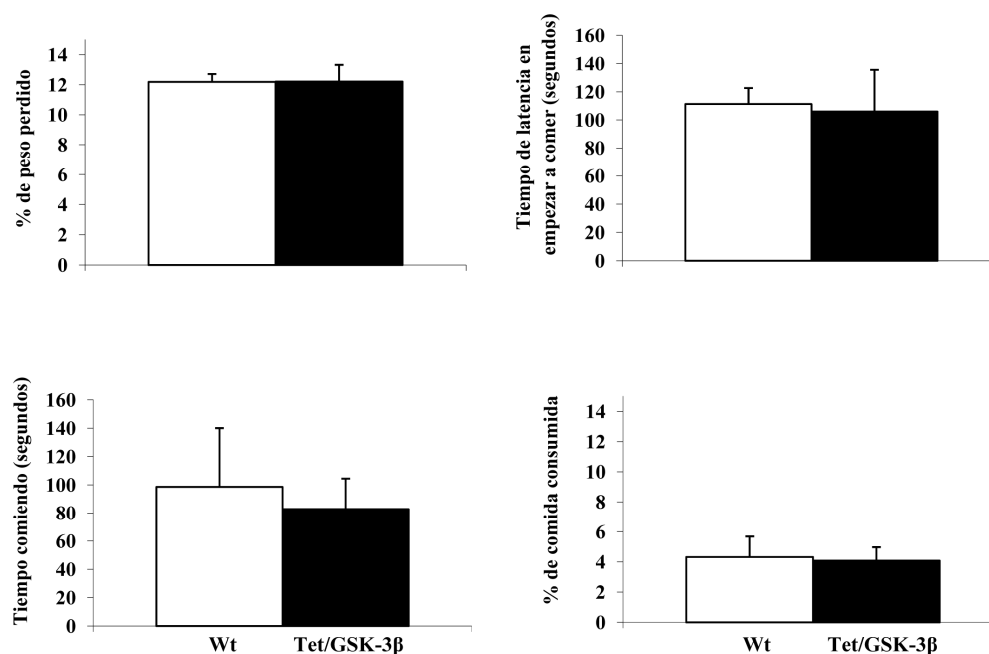


Figura 30. Test de alimentación suprimida por novedad. Histogramas representativos de los parámetros analizados: “Porcentaje de peso perdido”, “Tiempo de latencia en empezar a comer”, “Tiempo comiendo” y “Porcentaje de comida consumida”. (*t* de Student ; “Tiempo de latencia en empezar a comer” $p=0,884$; “Tiempo comiendo” $p=0,730$; “Porcentaje de comida consumida” $p=0,882$). Barras blancas = Wt ; barras negras= Tet/GSK-3β.

Estos resultados, junto con los datos previos obtenidos en el test *Openfield* en el que no se encontraron diferencias en términos de actividades verticales ni horizontales, tiempo empleado en el movimiento, tiempo empleado en la periferia *versus* la zona central o estereotipias (Hernandez *et al.*, 2002) demuestran que los ratones Tet/GSK-3β no presentan alteraciones en los comportamientos de tipo ansiedad o depresión.

2.6 Neurogénesis adulta en las regiones dorsal y ventral del hipocampo

Hasta el momento habíamos detectado notables diferencias tanto bioquímicas como morfológicas y celulares entre la región dorsal y ventral del hipocampo, que, de manera global parecían traducirse en efectos deletéreos para el hipocampo dorsal y efectos aparentemente inocuos para el ventral incluso a nivel comportamental. Teniendo en cuenta esto, así como

todas las alteraciones en neurogénesis adulta descritas en el [apartado 1](#) y referidas todas a la zona dorsal, nos propusimos estudiar si dicho proceso en la zona ventral se vería también inalterado.

2.6.1 Estudio de las alteraciones en los precursores DCX⁺ en el hipocampo dorsal versus el hipocampo ventral

Puesto que la expresión del transgen, tal y como se mostró en el [apartado 1.1](#), sólo se produce a partir de la etapa de diferenciación/maduración caracterizada por la expresión de DCX y, teniendo en cuenta las alteraciones en densidad celular, morfología y localización de los precursores positivos para dicho marcador, llevamos a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo que reconoce esta proteína y analizamos los resultados en las zonas dorsal y

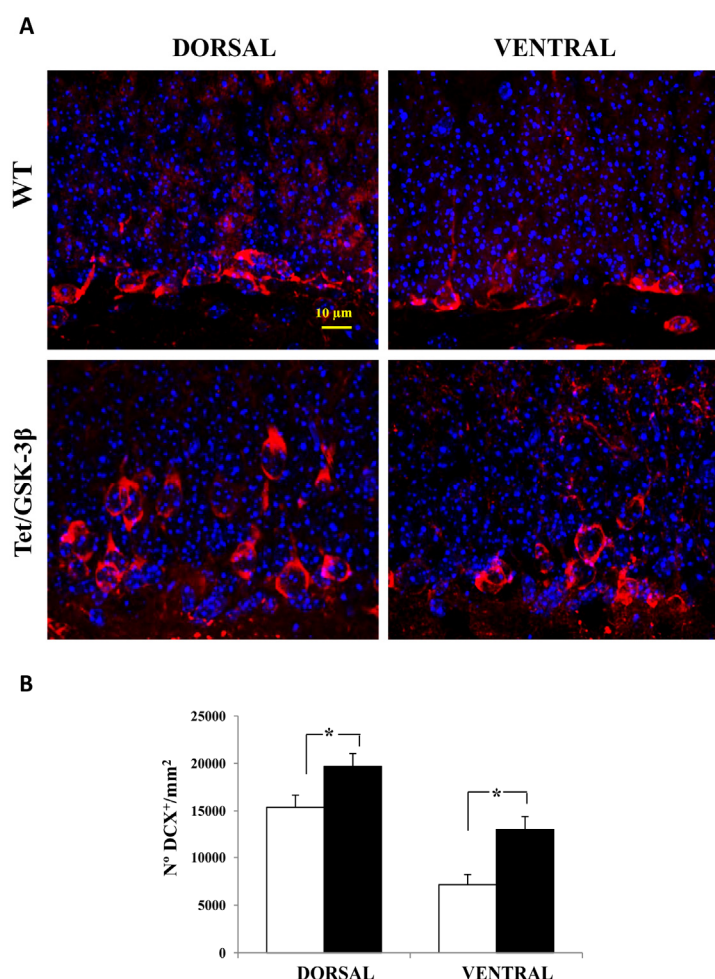


Figura 31. Estudio de la diferenciación/maduración en el GD dorsal versus GD ventral de animales jóvenes (2 meses de edad). **A.** Inmunofluorescencia con el anticuerpo DCX en secciones sagitales procedentes de animales silvestres (Wt) y animales transgénicos (Tet/GSK-3β). **B.** Cuantificación del número de células DCX⁺ expresada como densidad (n° de células/mm²). (ANOVA de dos vías; * $p < 0,05$). Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3β.

ventral del hipocampo de animales jóvenes de dos meses de edad. Como se aprecia en la [figura 31 A](#), la región ventral en comparación con la dorsal, tanto de animales silvestres como de animales transgénicos, parecía presentar un menor número de células positivas para el marcaje. Del mismo modo, al igual que lo descrito anteriormente para la zona dorsal, los individuos Tet/GSK-3β parecían tener más células DCX⁺ en su región ventral comparativamente a la de los animales control. Asimismo, estas células en la región ventral, parecían localizarse siguiendo el mismo patrón anómalo descrito para la zona dorsal. Al realizar la cuantificación del n° de células DCX⁺/mm²

podimos confirmar estas observaciones, siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas (**Fig. 31 B**).

A continuación, nos planteamos si este patrón se mantendría en animales de avanzada edad (trece meses). La tinción en inmunofluorescencia con el anticuerpo DCX y la posterior cuantificación, reveló que, si bien, tal y como se describió en el **apartado 1.4** el aumento de densidad de células DCX⁺ en los animales transgénicos se mantiene en la región dorsal, en la ventral, las diferencias observadas a dos meses desaparecen a los trece meses de edad (**Fig. 32**).

2.6.2. Proliferación

De igual manera que en la región dorsal, quisimos comprobar si, en el caso de la región ventral, el aumento en el número de precursores de tipo DCX

podría deberse a cambios en la etapa proliferativa, para lo cual realizamos una inmunofluorescencia con el anticuerpo PH3 en secciones sagitales de individuos jóvenes de dos meses de edad. En la **figura 33** se recogen imágenes representativas de las regiones dorsal y ventral del hipocampo de animales Wt y animales que sobreexpresan GSK-3 β y la correspondiente cuantificación. Como se observa, tampoco se encontraron diferencias significativas en la densidad de células PH3⁺ en el hipocampo ventral.

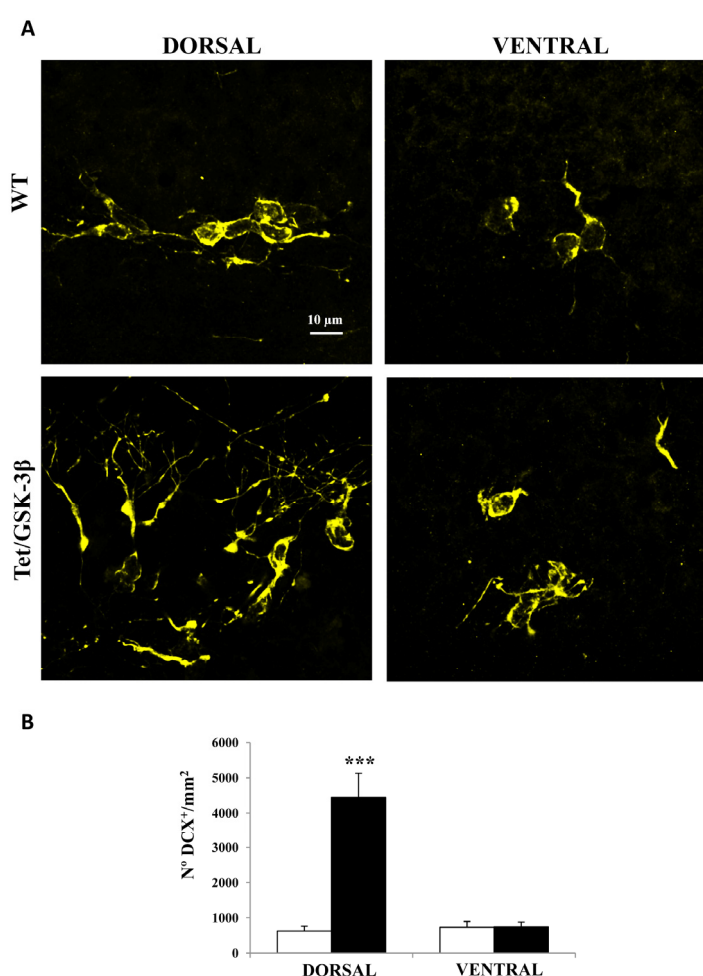


Figura 32. Estudio de la diferenciación/maduración en el GD dorsal versus GD ventral de animales viejos (13 meses de edad). **A.** Inmunofluorescencia con el anticuerpo DCX en secciones sagitales procedentes de animales silvestres (Wt) y animales transgénicos (Tet/GSK-3 β). **B.** Cuantificación del número de células DCX⁺ expresada como densidad (n° de células/mm³). (ANOVA de dos vías; *** $p < 0,001$). Barras blancas= Wt ; barras negras= Tet/GSK-3 β .

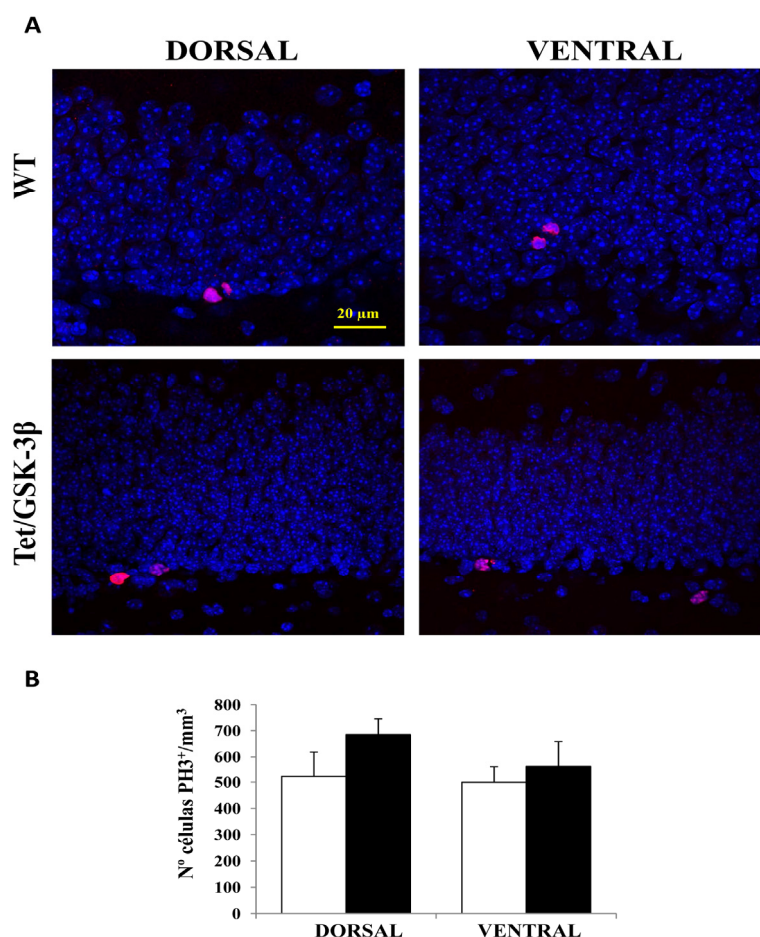


Figura 33. Estudio de la proliferación en el GD dorsal *versus* GD ventral. **A.** Inmunofluorescencia con el anticuerpo PH3 en secciones sagitales procedentes de animales silvestres y animales transgénicos (Tet/GSK-3β). **B.** Cuantificación del número de células PH3⁺ expresada como densidad (nº de células/mm³). (ANOVA de dos vías; $p=0,543$). Barras blancas= Wt ; Barras negras= Tet/GSK-3β.

3. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA

Alrededor de segunda semana postnatal es posible encontrar un pico en los niveles de las formas fosforiladas de la proteína tau que son reconocidas por el anticuerpo PHF-1 (epítipo cuya fosforilación es dependiente de GSK-3). Tras este periodo, los niveles disminuyen drásticamente (Brion *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando analizábamos extractos procedentes de cerebro de ratón adulto, aún éramos capaces de detectar inmunoreactividad con dicho anticuerpo (Fig. 34 A), por lo que nos planteamos el hecho de que este fenómeno pudiera estar relacionado de algún modo con la neurogénesis adulta.

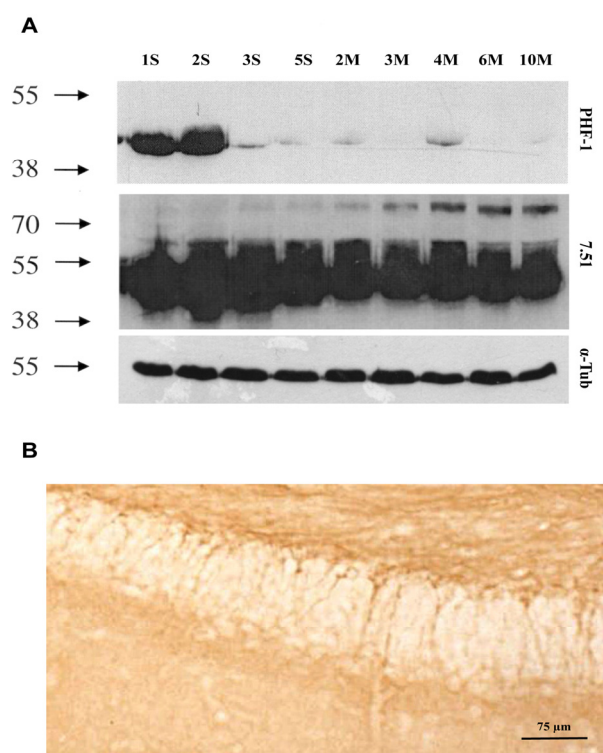


Figura 34. Presencia de tau fosforilado en la SGZ del hipocampo. **A.** *Western Blot* realizado en extractos procedentes de animales silvestres de diferentes edades utilizando los anticuerpos PHF-1, 7.51 y α -tubulina como control de carga. **B.** Inmunohistoquímica con el anticuerpo PHF-1 mostrando la presencia de marcaje en la SGZ hipocampal. (α -tub.= α -tubulina). S= semanas; M= meses.

3.1 Análisis de fosforilación de la proteína tau durante la neurogénesis adulta

3.1.1 Estudios de colocalización entre el anticuerpo PHF-1 y diferentes marcadores del proceso de neurogénesis adulta

Al llevar a cabo una tinción inmunohistoquímica con PHF-1 en secciones sagitales de animales silvestres, encontramos células positivas para el marcaje en la SGZ del giro dentado; células que además, morfológicamente resultaban similares a las células DCX⁺ (**Fig. 34 B**).

A la vista de estas observaciones, nos planteamos realizar mediante inmunofluorescencia, colocalizaciones entre el anticuerpo PHF-1 y distintos marcadores del proceso de neurogénesis adulta.

En primer lugar, llevamos a cabo la doble tinción con el anticuerpo DCX, que reconoce células en estadio de diferenciación/maduración. Como esperábamos, las células positivas para PHF-1 lo eran también para DCX en la SGZ del giro dentado (**Fig. 35; parte superior del panel**). Este hecho era también reproducible en la SVZ; otra de las principales regiones neurogénicas del cerebro (**Fig. 35; parte inferior del panel**).

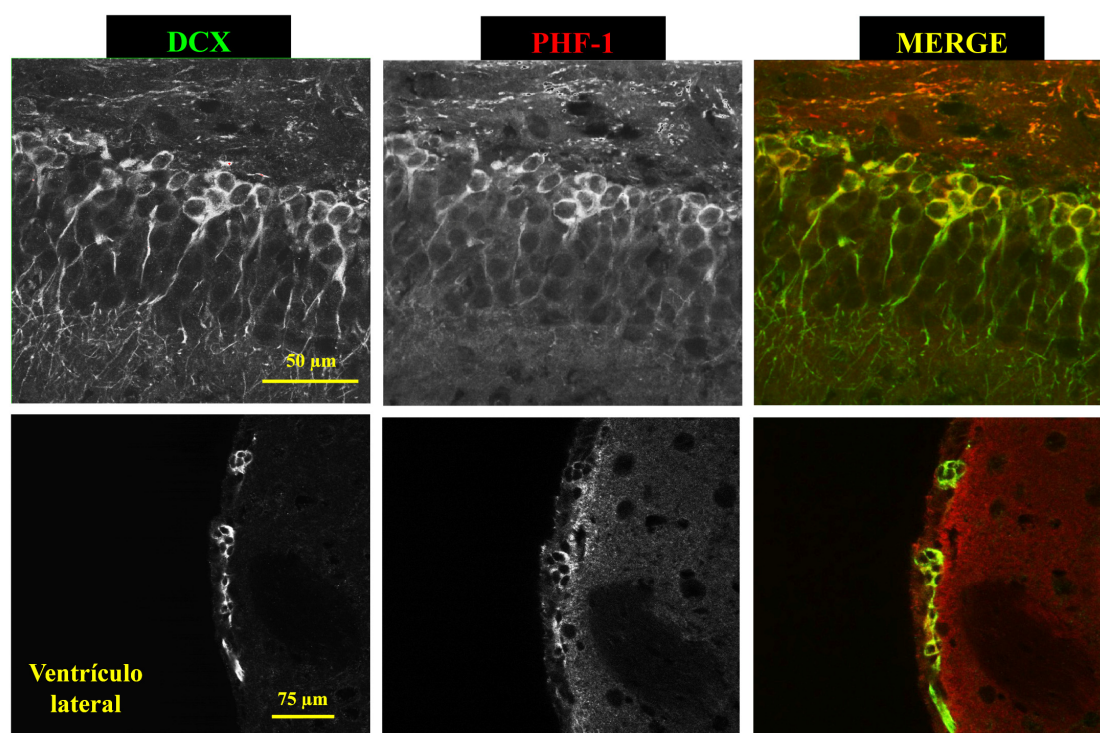


Figura 35. Colocalización entre los marcadores PHF-1 y DCX. Inmunofluorescencia doble con los anticuerpos DCX (canal verde) y PHF-1 (canal rojo) y la mezcla de ambos, *merge*, en la zona SGZ del hipocampo (parte superior del panel) y la SVZ (parte inferior).

A continuación, quisimos saber si en estadios anteriores al de diferenciación/maduración, como el de proliferación o en estadios aún más tempranos, ya éramos capaces de encontrar colocalización con PHF-1. El doble marcaje, por una parte con el marcador de células de tipo 1 o glia radial, GFAP, y por otra con el anticuerpo Ki-67 típico de células en división, demostró una ausencia de colocalización de ambos con PHF-1, corroborando que la fosforilación de tau en dicho epítipo empieza a manifestarse en estadios más tardíos de la neurogénesis adulta. Finalmente, llevamos a cabo el doble marcaje de PHF-1 con un marcador de neurona madura como la calbindina, encontrando que en este caso, también existía una ausencia de colocalización (Fig. 36).

Por tanto, la fosforilación detectada en el epítipo PHF-1 parecía restringirse a los precursores neuronales de tipo DCX.

3.1.2 Localización subcelular del marcaje con PHF-1

En las tinciones realizadas hasta el momento habíamos observado que el marcaje con el anticuerpo PHF-1 se localizaba en el compartimento somático, a diferencia del de DCX que era visible también en las dendritas apicales. Puesto que la fosforilación de la proteína tau reduce su afinidad por los microtúbulos (Lovestone *et al.*, 1996), pensamos que esta pudiera ser la explicación a la localización observada para PHF-1. Con el fin de comprobar esta

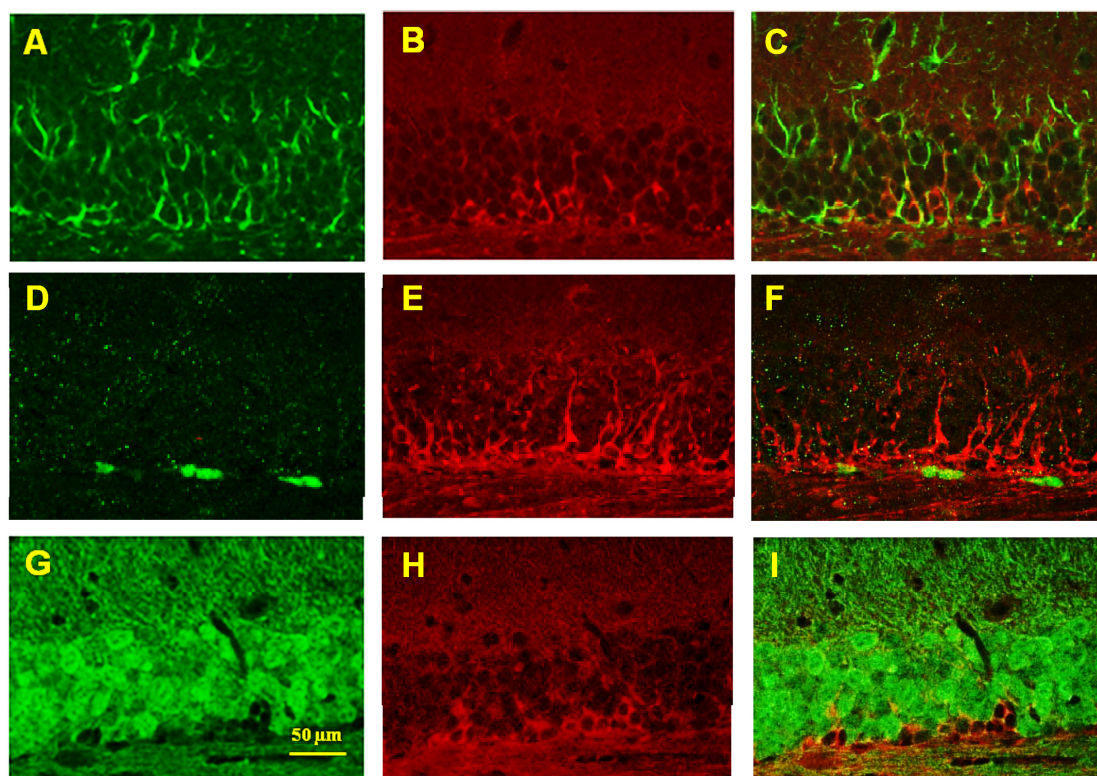


Figura 36. Expresión de PHF-1 en las distintas etapas del proceso de neurogénesis adulta. Inmunofluorescencia doble en secciones sagitales de animales Wt llevada a cabo con los anticuerpos GFAP (A), Ki-67 (D) y Calbindina (G) (canal verde) y el anticuerpo PHF-1 (B, E y H) (canal rojo). Los paneles C, F e I muestran la mezcla, *merge*, de ambos canales.

hipótesis llevamos a cabo una doble tinción con DCX y el anticuerpo 7.51; anticuerpo que reconoce a la proteína tau en su dominio de unión a microtúbulos y por tanto cuando no se encuentra unida a estos. Nuevamente, encontramos colocalización entre ambos marcadores y una ausencia de marcaje en cualquier otra célula del GD (Fig. 37 A-C). Además, el patrón de localización de 7.51 resultó ser similar al observado para PHF-1.

3.1.3 Estudio de otros epítomos de fosforilación de la proteína tau

Una vez habíamos determinado que la proteína tau fosforilada en el epítipo PHF-1 se encontraba en neuronas inmaduras positivas para el marcador DCX, nos plantemos si dicha proteína se encontraría fosforilada también en otros epítomos. Los estudios de colocalización con DCX y los anticuerpos AT-8 y 12e8, que reconocen los sitios de fosforilación serina 202 y 262 respectivamente, demostraron que, en las células DCX⁺, la proteína tau no sólo se encuentra fosforilada en el epítipo PHF-1, sino que también lo está en estos otros dos epítomos (Fig. 37 D-I).

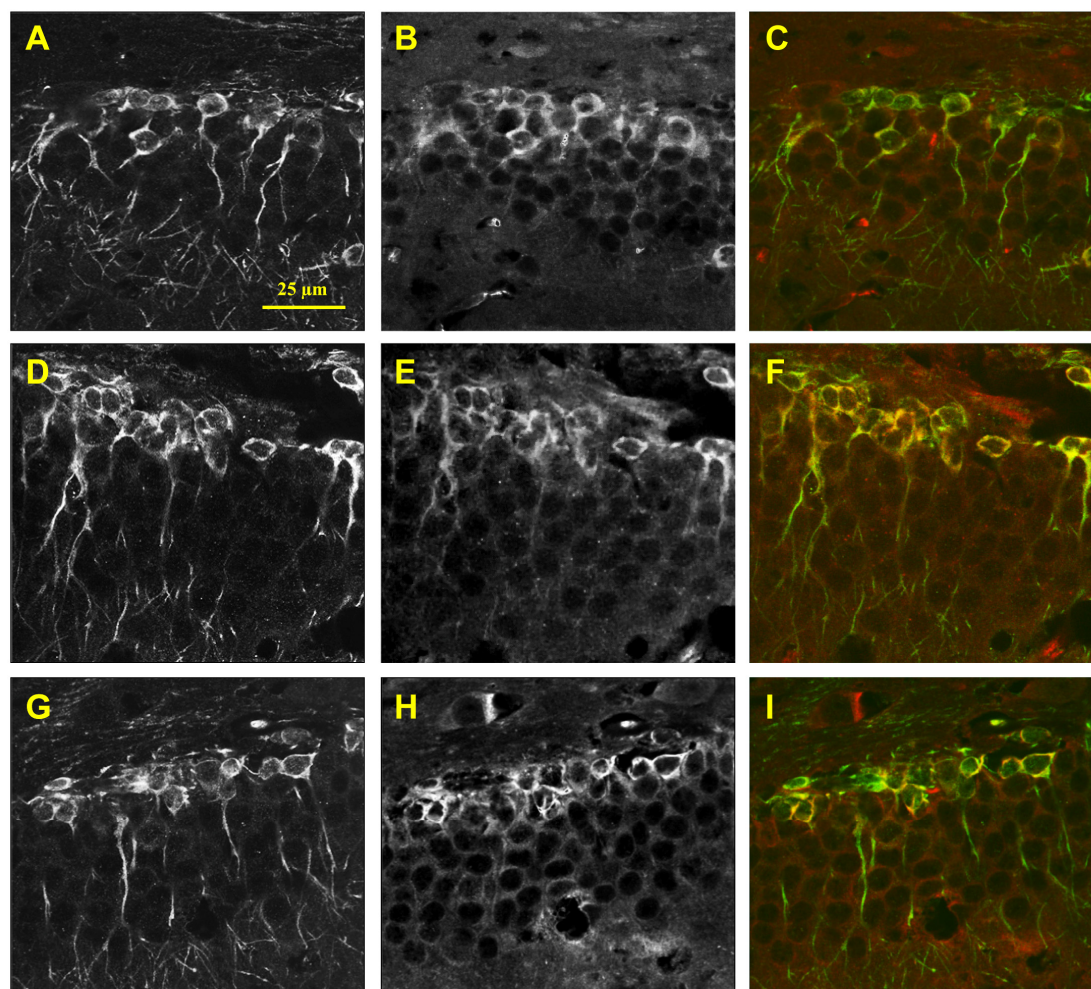


Figura 37. Colocalización del marcador DCX con anticuerpos que reconocen otros epítomos de la proteína tau. Inmunofluorescencia doble en secciones sagitales de animales Wt llevada a cabo con el anticuerpo DCX (**A, D y G**) (canal verde) y los anticuerpos 7.51 (**B**), AT-8 (**E**) y 12e8 (**H**). Los paneles **C, F** e **I** muestran la mezcla de ambos canales, *merge*.

3.2 Neurogénesis adulta en el ratón $\text{Tau}^{-/-}$ (*Knock out* o KO)

Tras haber estudiado la implicación de la fosforilación de tau en la neurogénesis adulta, quisimos determinar la posible implicación directa de esta proteína en el proceso. Para ello, utilizamos un modelo de ratón deficiente para la misma; el ratón $\text{Tau}^{-/-}$ (Dawson *et al.*, 2001), que fue cedido amablemente por el Dr. M. P. Vitek (Duke University, Durham, USA). En primer lugar, realizamos una tinción con el anticuerpo PHF-1 en secciones sagitales procedentes de estos animales. Como era de esperar, no encontramos marcaje alguno (**Fig. 38 A**). Al realizar la tinción con DCX, observamos que, si bien parecían no existir diferencias en cuanto a la densidad de estas, su patrón de localización en la capa subgranular sí parecía ser diferente. El conteo de células DCX^{+} confirmó las observaciones previas, no encontrándose diferencias entre los animales $\text{Tau}^{-/-}$ y los individuos silvestres control (**Fig. 38 B**). Sin embargo, al analizar el patrón de localización de la proteína DCX, encontramos un

porcentaje significativamente más bajo de células localizadas a más de 14,47 μm de la SGZ en los individuos deficientes para la proteína tau con respecto a sus controles (**Fig. 38 C**), sugiriendo un problema en la fase de migración/diferenciación de los precursores neuronales.

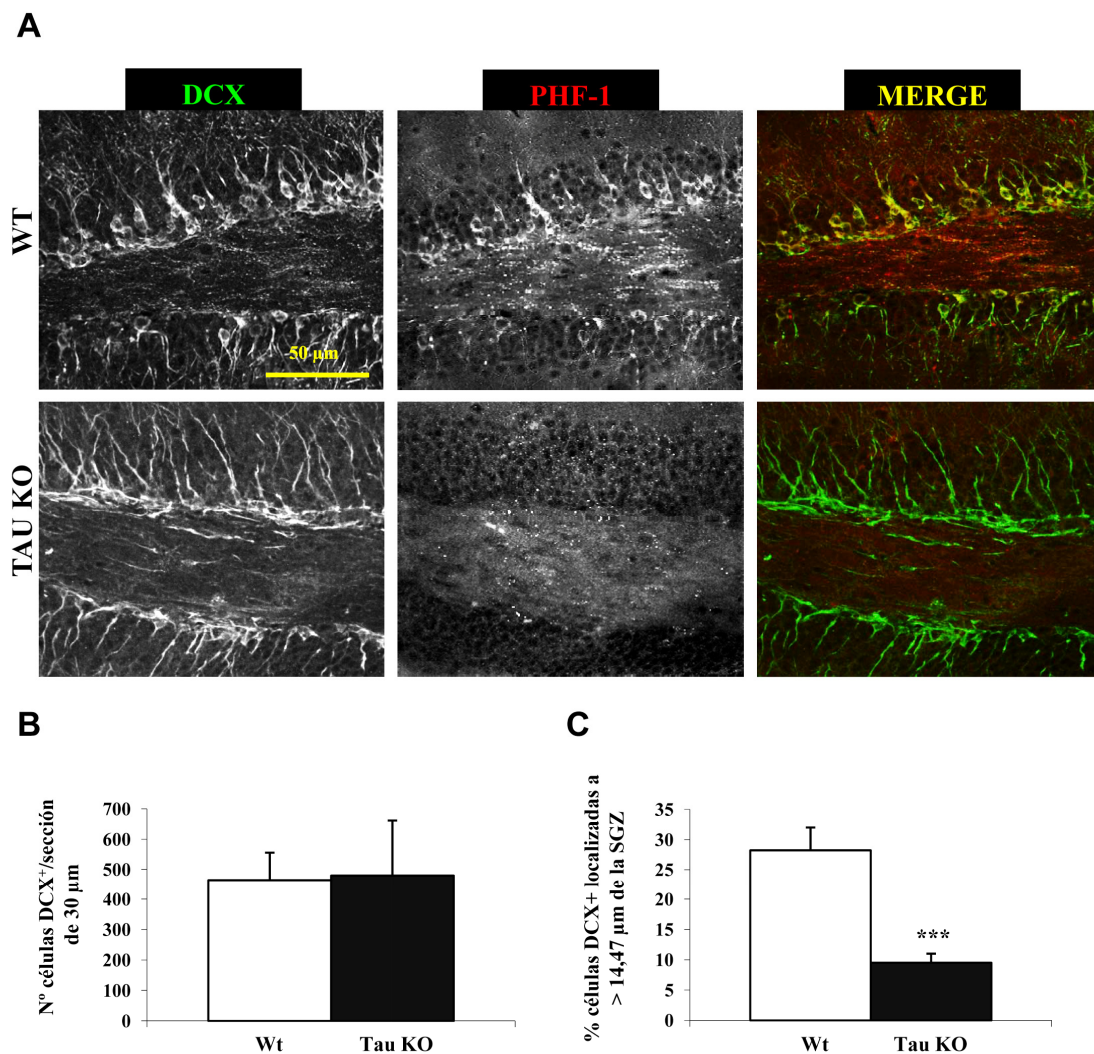


Figura 38. Neurogénesis en el ratón Tau KO. **A.** Colocalización mediante técnicas de inmunofluorescencia entre los marcadores DCX y PHF-1 en ratones Wt y ratones deficientes para la proteína tau (Tau KO). **B.** Cuantificación del número de células DCX⁺ expresado como nº de células/sección de 30 μm (*t* de Student; $p=0,405$). **C.** Histograma representativo del patrón de localización de la proteína DCX en la capa granular expresado como el porcentaje de células DCX⁺ que se encuentran a una distancia superior de 14,47 μm de la SGZ del GD. (*t* de Student; *** $p<0,001$).

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos estudiado las consecuencias que la sobreexpresión de GSK-3 β en el hipocampo tiene sobre el proceso de neurogénesis adulta. Para ello, nos hemos valido del modelo de ratón transgénico Tet/GSK-3 β desarrollado por nuestro laboratorio (Lucas *et al.*, 2001). La ventaja más atractiva que ofrece este modelo es la posibilidad de reprimir la expresión del transgen mediante la administración del análogo de tetraciclina que atraviesa la barrera hematoencefálica, doxiciclina, en el agua de bebida de los animales. Valiéndonos de esta útil herramienta, también hemos tratado de determinar si la inhibición de la sobreexpresión de GSK-3 β era capaz de revertir algunas de las alteraciones en neurogénesis adulta que observábamos en estos animales.

Asimismo, nuestros datos apoyan la idea de que el hipocampo no debe ser considerado como una estructura única sino como el conjunto de dos estructuras o regiones; dorsal y ventral. Así, hemos comprobado como la sobreexpresión de GSK-3 β afecta de manera diferencial a ambas regiones y hemos relacionado las alteraciones bioquímicas y celulares observadas con posibles cambios en procesos más complejos como los comportamientos relacionados con la memoria, el aprendizaje o los procesos de tipo ansiedad/depresión.

Finalmente, hemos demostrado que la proteína tau, uno de los principales sustratos de GSK-3 β , así como los eventos de fosforilación que esta proteína sufre, facilitan el proceso de neurogénesis adulta.

1. LA SOBREEXPRESIÓN DE GSK-3 β PROVOCA ALTERACIONES EN EL PROCESO DE NEUROGÉNESIS ADULTA

Para estudiar los posibles efectos de la sobreexpresión de GSK-3 β en la neurogénesis adulta era preciso determinar en primer lugar en qué momento del proceso comenzaba la expresión del transgen. Por ello se realizó un seguimiento temporal o *time-course* de la expresión del reportero β -galactosidasa utilizando los análogos de timidina IdU y CldU, lo cual nos permitió determinar que la sobreexpresión de GSK-3 β , aunque es perceptible en precursores de tres semanas de edad, no se hace realmente patente hasta las cuatro semanas. A las ocho semanas, ya es posible apreciar que un 56,75 % de los precursores son positivos para el marcaje con el anticuerpo anti- β -galactosidasa. Precisamente en este punto temporal, estos precursores son también positivos para el marcador DCX. Por otro lado, los estudios de colocalización entre el reportero y marcadores de las distintas etapas de la neurogénesis adulta nos permitieron confirmar que la expresión de GSK-3 β transgénica es patente en células en etapa de diferenciación/maduración que son positivas para DCX y no en fases anteriores como la de proliferación y en precursores tempranos (ausencia de colocalización con Ki-67 y nestina respectivamente). Estos estudios de colocalización también demostraron que la sobreexpresión persiste en etapas más avanzadas en las que la célula ya expresa marcadores típicos de la

condición postmitótica y madura (DCX colocaliza con NeuN).

En resumen, la expresión del transgen comienza en la fase de diferenciación/maduración, en precursores que son positivos para DCX, aunque, curiosamente, no todas las células que expresan el marcador están expresando el transgen, ya que sólo un 31,79 % de células DCX⁺ es positivo también para β -galactosidasa. La expresión de DCX tiene lugar en una ventana temporal muy amplia; desde dos horas después de la inyección de un análogo de timidina ya es posible encontrar precursores positivos para este marcador. Cuatro semanas después, el porcentaje de precursores que lo expresa es mínimo llegando a desaparecer por completo a los dos meses (Brown *et al.*, 2003). Así, cuando se realiza un marcaje con este anticuerpo estamos observando un conjunto heterogéneo de progenitores que se encuentran en diferentes estadios dentro del proceso de neurogénesis adulta. Por esta razón y, dado que nosotros observamos que el marcaje con β -galactosidasa comienza cuando las células cuentan tres/cuatro semanas de edad, sólo somos capaces de detectar cerca de un tercio de células DCX⁺ que están expresando nuestra proteína de interés.

Finalmente, y considerando que entre cuatro y seis semanas después de su formación las neuronas se encuentran ya totalmente integradas en el circuito sináptico y por tanto se las considera funcionales (Jones *et al.*, 2003), sería de esperar que a ocho semanas el porcentaje de precursores positivos para el reportero β -galactosidasa fuese muy elevado. Por el contrario, tan sólo encontramos que un 56,75 % de los precursores cumple esta premisa, lo cual podría sugerir que la población de células granulares maduras es heterogénea, o lo que es lo mismo, que no todas las neuronas granulares adultas estarían sobreexpresando GSK-3 β . De hecho, no todas las neuronas granulares parecen sobreexpresar el marcador β -galactosidasa, sugiriendo que el promotor CamKII α bajo el que se encuentra la proteína tTA no tiene el mismo nivel de activación en todas las células. Este fenómeno podría estar indicando a su vez una variabilidad en los nichos neurogénicos.

Las primeras alteraciones que detectamos en los animales Tet/GSK-3 β parecían afectar a la etapa de diferenciación/maduración. Esta etapa abarca un extenso período de tiempo durante el cual los precursores de tipo 2 y tipo 3 (siguiendo la nomenclatura de Kempermann, 2006) o células progenitoras intermedias, progresivamente adquieren características morfológicas y bioquímicas propias del linaje neuronal, y en la que migran y maduran para convertirse finalmente en una neurona adulta funcional. Prácticamente desde el inicio de esta etapa, los precursores empiezan a expresar marcadores como PSA-NCAM y DCX. De hecho, la expresión de este último se encuentra estrechamente relacionada con el comienzo de la diferenciación y la migración neuronal (Francis *et al.*, 1999).

Las células tipo 2a (las más tempranas) no expresan DCX, mientras que las tipo 2b ya empiezan a ser positivas para este marcaje (Kronenberg *et al.*, 2003). Por tanto, puede

considerarse que en el estadio de célula tipo 2 se produce la transición desde los precursores de tipo glia radial a células que van a seguir un destino neuronal. Por su parte, en el estadio de célula tipo 3 tienen lugar los cambios morfológicos más relevantes y supone la transición de una condición potencialmente proliferativa al estado de neurona postmitótica inmadura. Son estas células las encargadas de llevar a cabo la migración radial a lo largo de la capa granular (Kempermann, 2006), si bien la distancia recorrida por estas es limitada. La mayoría de las células permanecen en la SGZ y en el tercio interno de la capa; pocas alcanzan el tercio superior (Kempermann *et al.*, 2003). Al parecer, la posición final se alcanza aún durante el estadio de progenitor y apenas varía una vez que la célula ha alcanzado la madurez total (Kempermann, 2006). La migración es el resultado de complejos cambios morfológicos que incluyen tanto formas bipolares como multipolares y que requieren de una extensa remodelación que, en último término, implica cambios en la dinámica de los microtúbulos. La proteína DCX (proteína de unión a microtúbulos o MAP) está considerada como un factor esencial regulador de dicha dinámica. Es sustrato de numerosas quinasas por lo que es probable que su función estabilizadora de microtúbulos esté finamente regulada y sirva como punto de convergencia de diversas rutas de señalización (LoTurco, 2004). Otra MAP que parece tener importancia en este proceso es, como se discutirá más tarde y hemos demostrado en este trabajo, la proteína tau.

En este trabajo hemos descrito diversas alteraciones en el ratón Tet/GSK-3 β que afectan a los precursores positivos para DCX. La primera y más clara observación hace referencia a la densidad y al patrón de localización de estas células, así como a su morfología. Las tinciones mediante técnicas de inmunofluorescencia con el anticuerpo correspondiente, así como las posteriores cuantificaciones, nos muestran como los individuos transgénicos tienen una densidad significativamente más elevada de estas células, que además parecen localizarse en posiciones atípicas dentro de la capa granular presentando asimismo alteraciones en la bifurcación de la dendrita primaria.

En cuanto a la densidad, inicialmente nos planteamos la posibilidad de que dicho aumento se debiera a un incremento en la fase previa de proliferación. La utilización del marcador PH3, como se comentará más adelante, nos permitió descartar esta primera hipótesis, al no encontrar diferencias en términos de densidad celular entre los animales que sobreexpresan GSK-3 β y los animales silvestres utilizados como control. Simultáneamente, habíamos realizado tinciones con otros marcadores propios de la fase de diferenciación/maduración como son calretinina y NeuN. Gracias al triple marcaje con los anticuerpos que reconocen a estas proteínas y a la proteína DCX, fuimos capaces de detectar que, de una parte, y como se discutirá más adelante, existía un problema en la expresión de calretinina y/o NeuN, al haber encontrado en los individuos transgénicos, un porcentaje significativamente más bajo de células positivas para el marcaje con los tres anticuerpos. De otra parte, parecía existir un

problema en el apagado del marcador DCX, puesto que el menor porcentaje de células triples encontrado se debía a un aumento simultáneo de células DCX⁺ que, aún siendo positivas para NeuN resultaban negativas para calretinina. La expresión de calretinina está restringida a un corto período de tiempo en el cual la neurona ya ha adquirido la condición postmitótica y en el que se supone tiene lugar la formación de la mayor parte del árbol dendrítico (Brandt *et al.*, 2003) y el establecimiento de los contactos sinápticos dendríticos y axonales (Kempermann *et al.*, 2004a; Ming y Song, 2005). Inicialmente, la célula CR⁺ es también positiva para DCX. Posteriormente, la expresión de DCX cesa y durante un breve período, hasta que tiene lugar el recambio por calbindina, las células CR⁺ son sólo positivas a la vez para el NeuN (Brandt *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto, el mayor porcentaje de células positivas para DCX y NeuN pero negativas para calretinina, estaría indicando posibles problemas en el apagado de DCX, si bien no nos es posible descartar alteraciones en la expresión de calretinina. Esta hipótesis podría explicar el aumento en la densidad de células DCX⁺ encontrado en estos animales, ya que tal incremento correspondería a neuronas que, a pesar de haber alcanzado el estadio de madurez, no habrían dejado de expresar, como correspondería, dicho marcador. Valiéndonos de las inyecciones de análogos de timidina en distintos puntos temporales encontramos que, como esperábamos, en los animales Tet/GSK-3 β existe un mayor porcentaje de precursores que, a cuatro semanas, continua expresando DCX; a tres semanas no existen tales diferencias. Este hecho, no sólo confirma nuestra hipótesis en relación al apagado del marcador, sino que además resulta interesante si se tienen en cuenta otros dos datos presentados en esta tesis: (1) la expresión de GSK-3 β comienza de manera relevante en precursores de cuatro semanas de edad, tal y como demostramos al realizar el seguimiento temporal o *time-course* con el reportero β -galactosidasa y (2) en precursores que cuentan con setenta y dos horas y en los que por tanto aún no se está expresando el transgen, no se observan alteraciones en cuanto a la expresión de DCX. Tomando en cuenta estas observaciones, podríamos descartar problemas en el encendido del marcador y podríamos considerar que a partir de las cuatro semanas de edad, los precursores estarían viéndose directamente afectados por la sobreexpresión de GSK-3 β y el consecuente aumento de actividad de la quinasa previamente descrito en estos animales (Hernandez *et al.*, 2002). Esto tendría consecuencias sobre la proteína DCX, que recientemente, ha sido propuesta como nueva diana de GSK-3 β . En 2010, Bilimoria y colaboradores demostraron que la quinasa es capaz de fosforilarla en la serina 321, tanto *in vitro* como en cultivos de células HEK293 y también de neuronas (Bilimoria *et al.*, 2010). Desconocemos el mecanismo por el cual la fosforilación de DCX podría traducirse en un retraso en el apagado del marcador, y no descartamos que incluso, GSK-3 β pudiera estar regulando de algún modo la expresión génica de éste. Sin embargo, no disponemos de datos ni tampoco existe bibliografía al respecto que apoye esta hipótesis. Cabe resaltar que, amablemente, la Dra. Bonni nos cedió el anticuerpo

que reconoce el epítipo de DCX que es fosforilado por GSK-3 β y que fue utilizado en el trabajo anteriormente citado llevado a cabo por su laboratorio. Sin embargo, ni mediante inmunofluorescencia de tejido ni mediante *Western Blot* fuimos capaces de obtener un marcaje bien definido en nuestros animales.

En este trabajo también hemos descrito alteraciones en los precursores DCX⁺ concernientes tanto a su localización en la capa granular como a su morfología. En primer lugar, gracias a los recuentos celulares en los que la capa fue dividida en cuatro zonas o regiones, hemos sido capaces de determinar que la sobreexpresión de GSK-3 β conduce a un aumento significativo en el número de células DCX⁺ en la zona 2; una franja que abarca unas 28 μ m desde la SGZ (correspondiente aproximadamente al tercio interno de la capa granular). En el resto de regiones analizadas, aunque no de forma significativa, también es posible apreciar un incremento en el número de estas células. Esta localización atípica puede explicarse si se tiene en cuenta que gran parte de las células que se observan en el momento de revelar la tinción son neuronas que debieron haber dejado de expresar DCX. Por tanto, se trataría de neuronas que ya habrían adquiriendo su posición final en la capa granular dentro del circuito neuronal. Como resultado, en conjunto es posible observar numerosas células distribuidas de una forma desorganizada, alejándose esto de lo observado en los animales silvestres, en los que estas células se encuentran perfectamente alineadas con la SGZ siguiendo un patrón ordenado. Datos complementarios obtenidos en nuestro laboratorio mediante inyección estereotáxica de retrovirus que expresan la proteína GFP, permiten descartar alteraciones en la migración llevada a cabo por estas células a lo largo de la capa granular, al no haberse encontrado diferencias a este respecto entre los animales Tet/GSK-3 β y los animales silvestres (Llorens-Martin *et al.*; datos no publicados).

En segundo lugar, los análisis del árbol dendrítico de los precursores que expresan DCX, revela que los individuos transgénicos presentan un número significativamente más elevado de células en las que la bifurcación de la dendrita primaria tiene lugar en posiciones más cercanas al soma neuronal. Esta morfología aberrante que confiere a las células un aspecto arborescente, podría atribuirse a alteraciones en la organización de los microtúbulos. El exceso de actividad de GSK-3 β conduciría a modificaciones en algunos de sus sustratos como tau, MAP2 o la ya comentada proteína DCX, todos ellos con funciones esenciales para la correcta dinámica de la red microtubular (Sanchez *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 2001; Gomez de Barreda *et al.*, 2010), dificultando así la diferenciación morfológica y la maduración de los precursores. De hecho, la polimerización de los microtúbulos se encuentra alterada en los animales Tet/GSK-3 β . Así, cuando se llevan a cabo experimentos de polimerización de microtúbulos *in vitro* en homogenados hipocampales, la cantidad de tubulina polimerizada obtenida tras la adición de guanósín trifosfato (GTP) y posterior centrifugación, es menor en estructuras obtenidas a partir de los individuos transgénicos que en las obtenidas a partir de los animales

silvestres (Engel *et al.*, 2006a). Por otro lado, hay que tener en cuenta que no todas las células DCX⁺ en las que observamos alteraciones de este tipo han comenzado a sobreexpresar GSK-3 β o incluso es posible que no lleguen a hacerlo (tan solo el 31,79 % lo hacen). En este caso no estaríamos hablando de un efecto directo ejercido por el exceso de actividad GSK-3, sino de un efecto indirecto resultado de su sobreexpresión. Datos previos obtenidos en nuestro modelo ya proponen la existencia de un ambiente inflamatorio (incremento de la microglía activada; aumento de astrocitos reactivos) como consecuencia de un incremento en la muerte neuronal por apoptosis inducida por GSK-3 β (Lucas *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2006a; Sirerol-Piquer *et al.*, 2011) y son numerosos los trabajos que ponen de manifiesto las consecuencias negativas sobre la neurogénesis adulta, y en concreto sobre la diferenciación de los precursores, que se derivan de un entorno pro-inflamatorio (Ben-Hur *et al.*, 2003; Ekdahl *et al.*, 2003; Matarredona *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2007). Aunque se ahondará más a este respecto posteriormente, en este trabajo hemos podido constatar el aumento en la microgliosis reactiva así como el déficit en algunas moléculas protectoras como la fractalkina, el GM-CSF y el IFN- γ y el incremento en los niveles de una citoquina pro-inflamatoria, la eotaxina, que en su conjunto, estarían contribuyendo a alterar el ambiente en el que los precursores neuronales se desarrollan impidiendo que este proceso tuviera lugar correctamente.

Por último, hemos observado que los progenitores neuronales no sólo presentan defectos relacionados con el marcador DCX, sino que además parecen presentar problemas con la expresión del marcador NeuN. Nuestra primera evidencia se deriva del conteo de células que expresan simultáneamente DCX, calretinina y NeuN. Como ya se explicó, el porcentaje de células que cumple esta condición es significativamente más bajo en los animales transgénicos. Quisimos estudiar más en detalle la posible alteración en la expresión de NeuN, para lo cual llevamos a cabo el estudio en precursores de cuatro semanas de edad. Así, encontramos que en los individuos Tet/GSK-3 β , un porcentaje más elevado de estas células en comparación con animales silvestres, era positivo también para NeuN, sugiriendo una posible aceleración del proceso de maduración al menos en lo que a este marcador se refiere. De nuevo podríamos estar ante un efecto directo de la sobreexpresión de GSK-3 β , aunque desconocemos el mecanismo por el cual esto pudiera estar teniendo lugar; es posible también que pudiera tratarse de una alteración derivada de los defectos en maduración y diferenciación de los precursores previamente descritos. Del mismo modo, el ambiente celular anómalo podría jugar un papel importante en este fenómeno. Hasta la fecha, no existen datos bibliográficos acerca de la posible relación entre la quinasa y el antígeno nuclear. En cualquier caso se requerirían experimentos complementarios para determinar el momento en el que esta alteración empieza a aparecer.

En base a estos resultados es posible que estemos ante un fenómeno de desregulación

del proceso normal de diferenciación/maduración, en el que la secuencia y/o el encendido/apagado de marcadores parece encontrarse alterado, existiendo un desfase en el inicio y el final de dichos eventos. Considerando que la neurogénesis adulta recapitula los eventos que tienen lugar durante la neurogénesis embrionaria (Ming y Song, 2011), es factible pensar en una posible implicación de GSK-3 β en estos fenómenos si se tiene en cuenta que, en torno a las dos semanas de edad postnatales existe un pico de expresión de dicha proteína (Yu *et al.*, 2009) y que además, son muchos los datos que evidencian la importancia de la enzima para los procesos de formación neuronal (Zhou *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Chadborn *et al.*, 2006).

A continuación, nos propusimos estudiar si la sobreexpresión de GSK-3 β tenía efectos sobre etapas anteriores a la de diferenciación/maduración como es la de proliferación y sobre los progenitores neuronales más tempranos. Como ya hemos anticipado, no detectamos alteraciones en la tasa de proliferación en los animales transgénicos. Podemos atribuir esta ausencia de cambios a la falta de sobreexpresión de GSK-3 β en las fases iniciales de la neurogénesis adulta, la cual hemos demostrado mediante pruebas de colocalización de la β -galactosidasa con los marcadores nestina y Ki-67 y gracias al *time-course* del reportero.

Sin embargo, cuando analizamos la población de células nestina⁺, considerada como parte del conjunto de progenitores neuronales, encontramos que los individuos Tet/GSK-3 β presentan una densidad significativamente menor de estas células, a pesar de que en ellas aún no se está sobreexpresando el transgen. En este caso estaríamos de nuevo ante un efecto indirecto; las alteraciones en el entorno provocarían defectos en los precursores más tempranos que en último término acabarían muriendo. Aunque desconocemos por qué estas células a diferencia de las proliferantes sí se ven afectadas por las alteraciones en el ambiente, no se puede obviar el hecho de que se trata de poblaciones celulares diferentes y por tanto caracterizadas por la expresión de distintos marcadores, receptores celulares etc (Kempermann, 2006). Además, hay que tener en cuenta que de las células nestina⁺, parte son progenitores sin actividad mitótica (células tipo 1), y que probablemente sea esta subpoblación la que se vea especialmente afectada y no la subpoblación proliferante.

En esta tesis también hemos presentado resultados que demuestran que las alteraciones descritas en neurogénesis adulta en animales de dos meses y medio de edad persisten a edades más avanzadas. Del estudio en los distintos grupos de edad hemos podido determinar que: (1) la tasa de neurogénesis adulta disminuye con la edad tanto en animales transgénicos como en silvestres. Esto se refleja en una densidad celular decreciente que, en el caso de algunas poblaciones celulares como la de células nestina⁺, llega a ser mínima e indetectable por el marcaje con anticuerpos convencionales a trece meses de edad. La disminución de la neurogénesis adulta con la edad es un fenómeno que ha sido descrito previamente por

numerosos autores (revisado por Shruster *et al.*, 2010); (2) el aumento en la densidad de células DCX⁺ y su localización atípica con la edad, es un hecho cuya tendencia se aprecia desde el primer mes de vida y se mantiene a edades posteriores. A trece meses, aunque el número de células es bajo, aún es posible determinar un incremento en los individuos transgénicos; (3) la disminución en la densidad de las células nestina⁺ en los animales transgénicos también se detecta a edades posteriores, no así a un mes de edad. Probablemente, la generación de un ambiente celular nocivo para estas células como consecuencia de la sobreexpresión de GSK-3 β sea un proceso progresivo cuyos efectos sean indetectables en las fases iniciales. Teniendo en cuenta que la formación del GD se completa en la etapa postnatal cuando los animales cuentan aproximadamente un mes de edad (revisado por Li *et al.*, 2009), la expresión del transgen comenzaría en este período en la gran mayoría de células. Esto induciría la muerte de muchas de ellas, lo cual en último término se traduciría en cambios en el ambiente celular que comenzarían en torno al primer mes de vida y cuyos efectos deletéreos se harían patentes a edades más avanzadas. A dos meses y medio, ya somos capaces de detectar dichos efectos.

Con el fin de describir en mayor profundidad las posibles alteraciones en el entorno celular empezamos por estudiar la población microglial. Así, confirmamos que existe un aumento significativo de la densidad de este tipo celular medido gracias al marcador de microglía reactiva Iba-1. Este fenómeno ya fue observado durante la caracterización inicial del modelo (Lucas *et al.*, 2001), pero ha sido en el trabajo reciente llevado a cabo por nuestro laboratorio en colaboración con el Instituto Cavanilles en el que se ha propuesto una relación directa entre este y el proceso de neurogénesis adulta (Sirerol-Piquer *et al.*, 2011). En este estudio ya se describieron alteraciones en la diferenciación/maduración de los precursores neuronales como consecuencia de la sobreexpresión de GSK-3 β , que desembocarían en la muerte por apoptosis de los mismos. Esto induciría la activación de la microglía y los consecuentes cambios en el ambiente celular que contribuirían a producir más daños en el proceso de neurogénesis. Los datos obtenidos acerca de la población microglial demostraron un aumento en la densidad de estas células, su mayor activación dado el número de lisosomas y cuerpos heterogéneos observados en su citoplasma mediante microscopía electrónica así como su localización en torno a los nichos de la SGZ y a las neuronas de la GL en avanzado estado de degeneración.

Se sabe que el sistema inmune regula a la población neurogénica a través de la producción de citoquinas (Miller *et al.*, 2008; Bauer, 2009; Bonecchi *et al.*, 2009) y que la microglía es considerada su principal efector en el sistema nervioso central. En condiciones fisiológicas, se trata de una población quiescente encargada de la protección frente a daños neuronales, deposición de placas e infecciones por agentes patógenos (Pivneva, 2008;

Tambuyzer *et al.*, 2009). Sin embargo, un exceso de activación o una activación sostenida en el tiempo puede hacer que la microglía llegue a ser neurotóxica (Aloisi *et al.*, 2000). La microglía activada produce una serie de factores con efectos muy diversos sobre la neurogénesis adulta. Entre estos factores podemos destacar la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferon gamma (IFN- γ) o el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) (Ben-Hur *et al.*, 2003; Schwamborn *et al.*, 2003; Widera *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005; Whitney *et al.*, 2009).

En esta tesis hemos tratado de profundizar en lo referente a cambios en el entorno celular, estudiando diversas moléculas cuyos niveles pudieran estar alterados en nuestro modelo transgénico. Para ello llevamos a cabo el rastreo de sesenta y dos citoquinas (*array* de proteínas) el cual nos ha permitido por un lado, determinar la ausencia de cambios en moléculas como las interleuquinas o en factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y por otro, detectar posibles alteraciones en citoquinas como el IFN- γ , la fractalkina, el factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF) y la eotaxina (o CCL11). En los tres primeros casos hemos encontrado una disminución de los niveles de dichas moléculas, cuya acción sobre el SNC se considera, en términos generales, “protectora”. Así, se sabe que el IFN- γ promueve la diferenciación y el crecimiento de las neuritas y reduce la proliferación y supervivencia de los progenitores multipotentes (Ben-Hur *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004). El IFN- γ también aumenta la neurogénesis en un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Baron *et al.*, 2008). De este modo, la reducción en sus niveles podría estar contribuyendo a los defectos en la diferenciación de los precursores descritos en este trabajo. En este mismo sentido podría estar actuando el descenso en los niveles de GM-CSF, una citoquina cuyos efectos positivos sobre la diferenciación de los progenitores neuronales también ha sido descrita previamente (Kruger *et al.*, 2007). En cuanto a la fractalkina, se trata de una citoquina que, a diferencia de otras, es producida principalmente por las neuronas, mientras que su receptor, CX₃CR1, se encuentra en la microglía (Harrison *et al.*, 1998; Cardona *et al.*, 2006; Lauro *et al.*, 2008). La interacción entre ligando y receptor contribuye al mantenimiento de la microglía en un estado estacionario, controlando en parte su neurotoxicidad. Además, parece crítica para la regulación de la neurogénesis hipocampal (Bachstetter *et al.*, 2011). Disminuciones en los niveles de fractalkina como las observadas en el modelo Tet/GSK-3 β podrían contribuir por tanto a promover o mantener en el tiempo la activación de la microglía, fenómeno que, como se indicó con anterioridad puede llegar a resultar neurotóxico. Recientemente, un trabajo publicado por Cho y colaboradores demuestra como la señalización de fractalkina se encuentra alterada en cerebros de la enfermedad de Alzheimer (AD), estando los niveles de esta molécula significativamente disminuidos aunque no los de su correspondiente receptor (Cho *et al.*, 2011). Nuestros datos en el modelo que sobreexpresa GSK-3 β podrían estar reflejando de algún modo lo observado en humanos.

Finalmente, hemos encontrado un incremento en los niveles de eotaxina (también llamada CCL11), citoquina relacionada con las respuestas alérgicas pero no ligada previamente a envejecimiento, neurogénesis o memoria. Un trabajo reciente publicado por Villeda y colaboradores ha demostrado como los niveles en plasma de esta molécula se incrementan con el envejecimiento no sólo en ratones, sino también en humanos y como la administración sistémica de esta molécula en ratones jóvenes inhibe la neurogénesis adulta y provoca déficits en la memoria y el aprendizaje (Villeda *et al.*, 2011). En base a esto, creemos que el aumento en los niveles de eotaxina en los animales Tet/GSK-3 β podría estar relacionado con las alteraciones observadas en el proceso de neurogénesis adulta y con los déficits cognitivos observados en estos animales.

Por otro lado, mediante experimentos de PCR cuantitativa hemos podido comprobar que, en los animales que sobreexpresan GSK-3 β , no se ve afectada la expresión, no sólo de fractalkina y del IFN- γ , sino tampoco la de otros genes que codifican para factores neurotróficos y/o las vías de señalización en las que estos participan (BDNF, VEGF, IGFBP-3, TrkB), elementos de la sinapsis (subunidades del receptor de AMPA, enzima glutamato decarboxilasa, subunidades del receptor de NMDA) e interleuquinas (IL-6 e IL-10). La ausencia de cambios a nivel de expresión génica no implica que no puedan existir alteraciones a nivel de proteína.

Finalmente, es importante tener en cuenta que tanto los experimentos de *array* de citoquinas como el de *qRT-PCR* han sido realizados con extractos de hipocampo total; teniendo en cuenta que nuestra área de estudio se localiza en una subregión de esta estructura como es el GD y que sólo una pequeña fracción de células expresan receptores o son productoras de las citoquinas y/o factores de crecimiento y neurotróficos en cuestión, no descartamos que, de existir cambios a nivel de expresión génica y/o a nivel de proteína, estos dejarían de ser apreciables en extractos totales de hipocampo. Sería conveniente, en análisis posteriores, llevar a cabo una disección más precisa únicamente del GD, con el fin de restringir el estudio únicamente a esa subregión.

2. LAS ALTERACIONES EN NEUROGÉNESIS ADULTA RE-VIERTEN PARCIALMENTE CON LA ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA

Como ya se comentó, el modelo Tet/GSK-3 β ofrece la posibilidad de reprimir la expresión del transgen gracias a la administración del análogo de tetraciclina, doxiciclina, en el agua de bebida. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que el tratamiento con este antibiótico durante seis semanas era suficiente para reprimir por completo la sobreexpresión de GSK-3 β . Asimismo, esto conseguía revertir algunas de las

alteraciones descritas en el modelo como la acumulación de proteína tau hiperfosforilada en el epítipo PHF-1, la muerte neuronal, la astrocitosis reactiva y los déficits cognitivos (Engel *et al.*, 2006a). En esta tesis hemos tratado de determinar si la doxiciclina también es capaz de revertir las alteraciones observadas en neurogénesis adulta. En relación a esto podemos concluir por una parte, que el análogo de tetraciclina actúa de manera diferencial en las distintas etapas del proceso de neurogénesis y por otra parte, que la duración del tratamiento es fundamental para la consecución de sus efectos.

En cuanto a lo primero, nuestros datos demuestran como seis semanas de tratamiento en individuos de uno y tres meses de edad (**Grupos 1 y 2**) son capaces de revertir las alteraciones observadas en la densidad y la localización de las células DCX⁺. Puesto que existe un retraso en el apagado de este marcador como consecuencia de la sobreexpresión de GSK-3 β , creemos que al inhibirla, muchas de las células serían capaces de retomar el curso normal de la diferenciación; al recuperarse el apagado normal de DCX dejaríamos de observar el exceso de células aparentemente maduras localizadas en posiciones atípicas en la capa granular que se observan en el animal transgénico. La recuperación de los porcentajes normales en la triple tinción con DCX, calretinina y NeuN en los animales tratados con doxiciclina estaría apoyando esta idea. Curiosamente, cuando la doxiciclina es administrada a animales de doce meses de edad (**Grupo 3**) no es posible contrarrestar el exceso en la densidad de células DCX⁺. Esto, aunque pudiera deberse, como se comentará más adelante, a la duración del tratamiento (cuatro semanas), plantea la posibilidad de que la reversión en este sentido requiera de cierto grado de plasticidad que a edades avanzadas se pierde o es insuficiente. La plasticidad se define como la capacidad de reorganización del tejido nervioso a lo largo de toda la vida del individuo. La reorganización abarca desde cambios a nivel morfológico de neuronas y glía, a cambios a nivel funcional y cambios en el flujo sanguíneo local o el reemplazo celular (García-Segura, 2009). El componente de plasticidad neural consistente en el reemplazo celular es llamado reserva neurogénica (Kempermann, 2008). Con el envejecimiento se produce un declive en el proceso de neurogénesis adulta, que parece deberse en gran medida a cambios en el ambiente celular (Riddle, 2007). Por tanto, la pérdida de plasticidad en este sentido, sumada a los efectos deletéreos derivados de la sobreexpresión de GSK-3 β y prolongados en el tiempo, podría provocar que el sistema fuera incapaz de reparar los daños producidos en él mismo.

Por otro lado, el tratamiento de seis semanas con doxiciclina no supone una recuperación de la población de células nestina⁺, que constituyen el conjunto de progenitores neuronales. De acuerdo con esto, parece ser que, una vez que estos precursores mueren como consecuencia de las alteraciones en el ambiente consecuencia indirecta de la sobreexpresión de GSK-3 β , no es posible revertir este fenómeno.

Por último, hemos observado como el aumento en la densidad de células microgliales

Iba-1⁺ también se neutraliza con un tratamiento prolongado con doxiciclina. Esto estaría atenuando la producción de moléculas pro-inflamatorias que impedirían la correcta progresión del proceso de neurogénesis adulta. De hecho, se sabe que el uso de inhibidores de GSK-3 es capaz de reducir la migración de las células microgliales y de atenuar la producción de moléculas inflamatorias por parte de la microglía activada (Jope *et al.*, 2007).

En cuanto a la duración del tratamiento con doxiciclina, en este trabajo hemos podido determinar que son necesarias seis semanas para observar los efectos sobre la neurogénesis adulta. Dos semanas con el análogo de tetraciclina no consiguen restaurar la densidad normal de células DCX⁺ ni tampoco revertir el retraso en el apagado de este marcador. Un tratamiento de cuatro semanas tampoco consiguió revertir estas alteraciones en animales de doce meses. Considerando que este tiempo consigue disminuir un 70 % los niveles de GSK-3 β transgénica (Engel *et al.*, 2006a), nos planteamos la posibilidad de que en este caso no estemos ante un problema en la duración del tratamiento sino como ya se indicó, ante una pérdida de plasticidad con la edad o quizás un efecto combinado de ambos.

La inhibición de GSK-3 mediante el uso, tanto de aproximaciones farmacológicas como de aproximaciones genéticas, produce diversos efectos sobre el proceso de neurogénesis adulta. Así, el uso de litio y otros inhibidores protege a los precursores neuronales de la muerte por apoptosis (Eom *et al.*, 2007) y promueve la diferenciación de los mismos (Kim *et al.*, 2004). Por otro lado, se considera que la desregulación de GSK-3 es un hecho clave en el desarrollo de la patología de la enfermedad de Alzheimer (Avila *et al.*, 2004; Jope y Johnson, 2004). La implicación sugerida para la misma en los procesos de neurodegeneración y neurogénesis, así como los datos presentados en esta tesis, apoyan la idea de que esta quinasa constituye una interesante diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. De hecho, muchos de los fármacos que en la actualidad se encuentran en fase clínica están dirigidos a modular la actividad de esta proteína (Avila y Hernandez, 2007). Sin embargo, y aunque la inhibición de GSK-3 β revierte muchas de las alteraciones que presenta este modelo transgénico, nuestros resultados también demuestran que, episodios dañinos para el cerebro como en nuestro caso es un exceso transitorio de GSK-3 β , provocan daños irreversibles, como es el agotamiento de células precursoras de tipo nestina⁺. Por tanto, el momento en el que los inhibidores de la proteína deberían ser suministrados parece representar un punto clave a la hora de alcanzar un buen resultado tras la terapia. Así, el uso de inhibidores de la proteína en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer podría resultar efectivo, mientras que en estadios más avanzados sería conveniente combinar estos antagonistas con el uso de terapias enfocadas al reemplazamiento de los precursores neuronales. De hecho, se han descrito mejoras en la memoria tras el trasplante de precursores neuronales en un modelo en el que se había inducido la pérdida de estos (Yamasaki *et al.*, 2007).

3. LA SOBREEXPRESIÓN DE GSK-3 β AFECTA DE MANERA DIFERENCIAL A LAS REGIONES DORSAL Y VENTRAL DEL HIPOCAMPO

En nuestro segundo objetivo de la tesis nos habíamos propuesto determinar si la sobreexpresión de GSK-3 β afecta de manera diferencial a las regiones dorsal y ventral del hipocampo, dado que son numerosos los datos que apoyan el hecho de que el hipocampo no debe ser considerado como una estructura única (revisado por Fanselow y Dong, 2010). Así, hemos encontrado diferencias a nivel bioquímico, celular e incluso a nivel de comportamiento, que demuestran que ambas regiones no se ven igualmente afectadas por la sobreexpresión de GSK-3 β .

Nuestros primeros datos demuestran cómo la sobreexpresión de GSK-3 β se produce por igual en las regiones dorsal y ventral hipocampales. Así, los niveles de la proteína transgénica medidos por *Western Blot* y la cuantificación en inmunofluorescencia de células Myc⁺ (Myc es el epítipo que marca la proteína transgénica) en el GD, revelan una ausencia de diferencias en ambas áreas. Esto sugiere que las alteraciones descritas en el hipocampo dorsal y en el ventral se deben a la distinta susceptibilidad de cada región a la sobreexpresión de GSK-3 β y no a diferencias en los niveles de expresión del transgen.

Los resultados presentados que permiten responder el segundo objetivo de esta tesis, demuestran que la región dorsal es más susceptible a la neurodegeneración inducida por la sobreexpresión de GSK-3 β que la región ventral. Esta conclusión se apoya en las siguientes observaciones: (1) existe una reducción significativa en la densidad de neuronas granulares en el GD dorsal que no es apreciable en el GD ventral; (2) sólo en la región dorsal, es posible apreciar un incremento en la tasa de muerte por apoptosis de las neuronas de la capa granular; (3) el volumen del GD dorsal disminuye significativamente con la edad, fenómeno que no ocurre en el caso del GD ventral (4) la sobreexpresión de GSK-3 β , que se traduce en niveles similares de la proteína tal y como se comentó anteriormente, está acompañada de un fenómeno de astrocitosis reactiva sólo en el caso del hipocampo dorsal; (5) de acuerdo con estas observaciones previas, el comportamiento de tipo ansiedad/depresión (medido gracias a los test de luz/oscuridad y de alimentación suprimida por novedad) que se considera que puede estar más relacionado con la región ventral hipocampal, no se encuentra alterado. Por su parte, los déficits cognitivos, en mayor relación con el hipocampo dorsal, sí son apreciables en estos animales (Hernandez *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2006a).

Nuestros resultados muestran como un incremento en los niveles de GSK-3 induce una patología severa, apoyando la hipótesis que propone la desregulación de esta quinasa como un

evento clave en el fenómeno de neurodegeneración. Sin embargo, parecen existir importantes diferencias entre las neuronas; de manera más precisa, algunas neuronas activan un programa apoptótico mientras que otras parecen sobrevivir. Así, entre las neuronas del GD dorsal, existe un número significativamente más elevado que sufre apoptosis (medido a través de la cuantificación en inmunofluorescencia de células fractina positivas), mientras que en el caso del GD ventral esto no ocurre; las neuronas de la capa granular de esta región parecen resistir mejor los estímulos que inducen apoptosis. El incremento de la muerte neuronal ya se asoció en los primeros estudios realizados en este modelo transgénico con el desarrollo de un proceso neuroinflamatorio (Lucas *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2006a). Por tanto, no es de extrañar que en este caso, el aumento de células fractina⁺ en la capa granular del GD dorsal se vea acompañado de un aumento en la densidad de células GFAP⁺ de tipo reactivo únicamente en esta región.

Las diferencias encontradas entre las regiones dorsal y ventral (aumento de los niveles de GSK-3 fosforilada en la región ventral, incremento de la astrocitosis reactiva y la muerte neuronal en el hipocampo dorsal, una menor densidad de neuronas granulares también en esta región y atrofia del GD dorsal a edades avanzadas) llevan a plantearse cómo la sobreexpresión de GSK-3 β puede llegar a inducir la degeneración del GD dorsal mientras que el GD ventral parece estar protegido. Ambas regiones difieren, no sólo en la expresión génica, sino también en la conectividad neuronal (Fanselow y Dong, 2010). Teniendo en cuenta que GSK-3 β es una enzima que tiene amplios efectos en el metabolismo neuronal, en la expresión génica (Jope y Johnson 2004), la remodelación del citoesqueleto, en la plasticidad, en el transporte intracelular así como en la supervivencia neuronal (Grimes y Jope, 2001), nuestros resultados sugieren que las vías de transducción que modulan a GSK-3 podrían ser diferentes en ambas áreas.

Está bien establecido que la actividad de GSK-3 β está regulada, entre otros mecanismos, por fosforilación en la serina 9; fosforilación llevada a cabo principalmente por Akt (Cross *et al.*, 1994; Cross *et al.*, 1995). Asimismo, se sabe que su inhibición es un evento común en la neuroprotección llevada a cabo por diferentes factores de supervivencia (Jope y Johnson, 2004). Tanto en animales silvestres como en los transgénicos, hemos encontrado que los niveles de GSK-3 β son similares en ambas áreas. Sin embargo, la fosforilación de Akt en la serina 473, que supone su activación, es mayor en el hipocampo ventral. Correlacionando con esto, la cantidad de GSK-3 β fosforilada en serina 9 también es más elevada en esta región. Teniendo en cuenta los niveles de Akt activa y de GSK-3 β inactiva, cabe suponer que el hipocampo ventral se vería más protegido frente al incremento de actividad de GSK-3 β . Sin embargo, son necesarios estudios más profundos que permitan especificar el mecanismo responsable de estas diferencias así como los factores que confieren a las neuronas del GD dorsal esa particular sensibilidad a los fenómenos neurodegenerativos.

Por otra parte, el test de luz/oscuridad y el de alimentación suprimida por novedad, que miden componentes del comportamiento de tipo emocional, así como los datos previos en

relación a las pruebas de reconocimiento de objetos y al test de Morris Water Maze (Hernandez *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2006a), que miden las capacidades cognitivas, aportan un significado funcional a los resultados bioquímicos, morfológicos y celulares obtenidos. De este modo, la ausencia de un proceso neurodegenerativo en la región ventral hipocampal explicaría que no se vean alterados los comportamientos de tipo ansiedad/depresivos. Por otro lado, las alteraciones observadas en el hipocampo dorsal y que, en último término suponen una atrofia del GD, acabarían traduciendo en déficits en la memoria espacial y el aprendizaje.

De acuerdo con los resultados discutidos previamente, las alteraciones descritas en neurogénesis adulta serían en su mayor parte la causa de muchos de los déficits descritos en el modelo Tet/GSK-3 β . Sin embargo, al analizar el proceso de neurogénesis adulta de manera detallada e independiente en las regiones dorsal y ventral del hipocampo, hemos comprobado que a la edad de dos meses, momento aproximado en el cual observamos con mayor claridad todos los cambios que afectan a la zona dorsal, el GD ventral muestra también las mismas alteraciones. Así, nuevamente encontramos una mayor densidad de células DCX⁺ anormalmente posicionadas en la capa granular sin que existan cambios en la tasa proliferativa. Curiosamente, cuando estos análisis se llevan a cabo en animales de trece meses de edad, las alteraciones en la densidad de estas células, que aún persisten en la región dorsal tal y como se discutió con anterioridad, no se observan en el área ventral, en la cual las cifras se igualan a las encontradas en individuos control. Estos datos resaltan de nuevo que las estructuras dorsal y ventral del hipocampo responden de manera diferente a los efectos derivados de la sobreexpresión de GSK-3 β . Aunque a dos meses las alteraciones que afectan a la región dorsal parecen reproducirse exactamente en la región ventral, estas dejan de manifestarse con el tiempo, de manera que a edades avanzadas no es posible detectarlas. Esta capacidad podría explicar que el volumen del GD ventral permanezca prácticamente inalterado, y que los animales tampoco muestren alteraciones en los comportamientos de tipo ansiedad/depresión estrechamente ligados a esta región (Fanselow y Dong, 2010). Sin embargo, se requieren estudios más detallados para tratar de determinar el mecanismo por el cual las alteraciones en los precursores neuronales en el GD ventral no llegan a traducirse en los mismos efectos que en el GD dorsal.

Por otro lado, nuestros resultados confirman los estudios previos que demuestran que existen diferencias en el proceso de neurogénesis adulta entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo (Jinno y Kosaka, 2010). Así, hemos corroborado que en la región dorsal la densidad de células DCX⁺ es mayor que en el área ventral en animales jóvenes.

En resumen, en esta parte se ha demostrado que las regiones dorsal y ventral del hipocampo no se ven afectadas del mismo modo en nuestro modelo transgénico, de manera que la región dorsal es más vulnerable a los efectos derivados de la sobreexpresión de GSK-3 β

que la región ventral. Estos resultados podrían en parte ayudar a comprender por qué en algunas patologías neurodegenerativas las alteraciones cognitivas y emocionales no ocurren al mismo tiempo. Desde una perspectiva más general, estos resultados apoyan la idea de que el hipocampo no debe ser considerado una estructura única (Fanselow y Dong, 2010) y que por tanto, los estudios relacionados con los procesos neurodegenerativos deberían ser investigados de manera independiente en las regiones dorsal y ventral.

4. LA PROTEÍNA TAU FACILITA EL PROCESO DE NEUROGÉNESIS ADULTA

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran la implicación de la proteína tau en el proceso de neurogénesis adulta, así como la importancia de los fenómenos de fosforilación de la misma en dicho proceso. En primer lugar, hemos observado como la fosforilación en un epítipo característico de GSK-3 y de la forma fetal de tau (PHF-1) se mantiene en los animales adultos, y en concreto, en los precursores neuronales implicados en neurogénesis. Los estudios de colocalización entre el anticuerpo PHF-1 y los diferentes marcadores de cada una de las etapas del proceso, nos han permitido determinar que dicha fosforilación sólo ocurre durante los estadios de diferenciación y migración, como demuestra el doble marcaje con el anticuerpo DCX y la ausencia de colocalización con los marcadores de proliferación y de neuronas maduras adultas, Ki-67 y calbindina respectivamente. Este fenómeno se ha podido observar en las dos regiones en las que tiene lugar la neurogénesis adulta: la zona subgranular (SGZ) y la zona subventricular (SVZ), indicando que, efectivamente, la fosforilación de tau está implicada en el proceso y no se trata de un fenómeno local. Asimismo, nuestros datos sugieren que podría estar jugando un papel importante en el proceso de migración de las neuronas en formación. Hemos observado como el marcaje con el anticuerpo PHF-1 tiende a concentrarse en el soma neuronal del mismo modo que lo hace el anticuerpo 7.51, que sólo reconoce a la proteína tau cuando no se encuentra unida a los microtúbulos (tau libre). Además, el marcaje con 7.51 tan solo se encontró en células DCX⁺ y no en neuronas granulares adultas, poniendo de manifiesto que la mayor cantidad de tau libre se encuentra en los precursores neuronales que se están diferenciando. Teniendo en cuenta que la unión de tau a los microtúbulos supone la estabilización de los mismos (Drechsel *et al.*, 1992), que la fosforilación de la proteína reduce su afinidad por la unión a estos (Lovestone *et al.*, 1996) y que el proceso de migración neuronal requiere de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Feng y Walsh, 2001), la presencia de tau libre fosforilado en el epítipo PHF-1 únicamente en los precursores neuronales en fase de diferenciación, estaría contribuyendo a conferir la plasticidad requerida para el proceso de migración durante la neurogénesis adulta. Cabe

destacar que en los primeros estadios del desarrollo embrionario, en los cuales la plasticidad es fundamental, también se observa un incremento en la fosforilación de tau (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989). Del mismo modo, el que las células DCX⁺ presenten tau libre, concuerda con el hecho de que en estas, la isoforma existente de la proteína sea la que posee 3 repeticiones y no 4 en su dominio de unión a microtúbulos (tau 3R) (Bullmann *et al.*, 2007); isoforma que posee menor afinidad por su unión a estos (Dayanandan *et al.*, 1999). Finalmente, se sabe que las neuronas maduras, que poseen tau 4R, aparentemente tienen una menor plasticidad y en ellas la fosforilación de tau se ve reducida (Sennvik *et al.*, 2007). Por tanto, los fenómenos de fosforilación parecen tener una relevancia fisiológica durante la formación de nuevas neuronas.

Nuestros experimentos con los animales carentes de la proteína tau (ratones Tau *knock-out*) nos han permitido, asimismo, determinar la importancia de la proteína en la neurogénesis adulta. En estos animales, hemos observado como la falta de tau no se refleja en una disminución en el número de precursores en diferenciación, tal y como demuestra el marcaje con DCX y el posterior recuento de las células positivas para éste. Sin embargo, la reducción en el número de células que se localizan a más de 14,47 µm de la SGZ, nos indica que estos animales podrían presentar defectos en la migración de los precursores. Sería necesario un análisis más completo utilizando análogos de timidina para corroborar esta hipótesis.

La alteración parcial y no total de la neurogénesis que observamos en estos animales podría explicarse debido a los posibles efectos compensatorios ejercidos por otras proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Estudios previos realizados en ratones doble *knock-out* para la proteína tau y MAP1B demuestran este fenómeno (Takei *et al.*, 2000).

En conclusión, los experimentos llevados a cabo en esta parte del trabajo ponen de manifiesto que la proteína tau facilita el proceso de neurogénesis adulta, si bien, no es esencial para el mismo.

5. IMPLICACIÓN DE LOS DEFECTOS OBSERVADOS EN NEUROGÉNESIS ADULTA EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS; ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La desregulación de GSK-3 ha sido ligada a numerosas afecciones neuropatológicas. Entre estas se incluyen el trastorno bipolar (Klein y Melton, 1996), la esquizofrenia (Kozlovsky *et al.*, 2002), la enfermedad de Huntington (Carmichael *et al.*, 2002), la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (Engel *et al.*, 2006b) y la

enfermedad de Alzheimer (Avila *et al.*, 2004).

La enfermedad de Alzheimer es una demencia que implica una pérdida progresiva de las capacidades cognitivas así como fallos en la memoria. Puede dividirse en dos categorías: la enfermedad de tipo familiar o monogénica (FAD) o de tipo esporádico o poligénica. La enfermedad de tipo familiar es consecuencia de la mutación en tres genes diferentes: el gen que codifica para la proteína precursora del amiloide, APP (Goate *et al.*, 1991) y los genes que codifican las presenilinas 1 y 2 (PS-1 y PS-2) (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1996).

En los tres casos, las mutaciones en estos genes suponen, en último término, un incremento en la actividad de GSK-3 β (Busciglio *et al.*, 1995; Takashima *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1997; Price y Sisodia, 1998; Takashima *et al.*, 1998; Baki *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2007; Magdesian *et al.*, 2008). Esta activación podría desregular ciertos mecanismos implicados en la diferenciación, la migración y la muerte neuronal. Además, esta quinasa modifica la actividad de β -catenina debido a su participación en las rutas intracelulares de transducción de señales mediadas por insulina y la vía de Wnt (Barth *et al.*, 1997). La interrupción de la señalización mediada por β -catenina reduce la proliferación y la neurogénesis en la enfermedad de Alzheimer, promoviendo una salida prematura del ciclo celular y bloqueando la maduración (Adachi *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2007; He y Shen, 2009; Mao *et al.*, 2009).

El modelo Tet/GSK-3 β recapitula muchos de los aspectos neuropatológicos de la enfermedad (Lucas *et al.*, 2001). Basándonos en los resultados presentados en esta tesis así como en datos previos obtenidos por nuestro laboratorio, proponemos un modelo para explicar los efectos de la sobreexpresión de GSK-3 β (Fig. 39). El aumento en la actividad de la proteína provoca de forma directa y/o indirecta alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta. Los efectos directos se deberían a la sobreexpresión del transgen en algunos de los precursores neuronales, provocando defectos en la diferenciación/maduración de los mismos (alteraciones en la densidad y morfología de células DCX⁺, retraso en el apagado de este marcador) que provocarían una salida prematura de ciclo mediada quizás por la señalización de β -catenina y que, en último término, induciría la muerte de estos por apoptosis. A su vez, esto conduciría a la activación de la microglía y a cambios en el entorno celular como consecuencia de la alteración en los niveles de moléculas de distinta naturaleza como factores neurotróficos, moléculas excitotóxicas, neurotransmisores etc. Los niveles disminuidos de citoquinas protectoras como la fractalkina, el IFN- γ y la GM-CSF y el aumento en los niveles de eotaxina, estarían contribuyendo a la generación de un entorno inadecuado para la correcta formación de las nuevas neuronas. Así, este ambiente celular atípico constituiría lo que hemos considerado como efectos indirectos derivados de la sobreexpresión de GSK-3 β , cuyas consecuencias serían la alteración en la densidad de células nestina⁺ y los distintos efectos

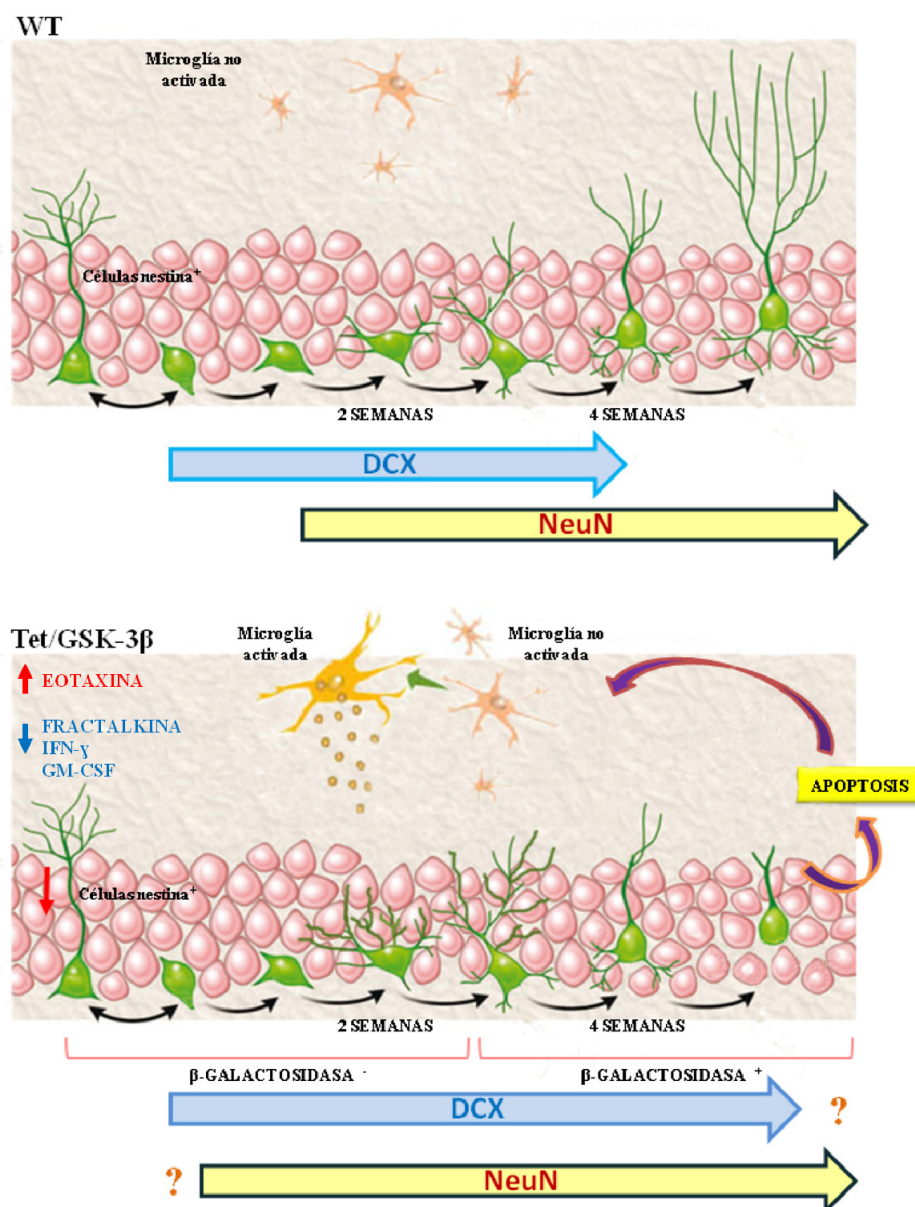


Figura 39. Modelo propuesto para explicar las alteraciones en neurogénesis adulta observadas en el ratón Tet/GSK-3β. El esquema representa el progreso de una neurona desde su nacimiento hasta la consecución del estado maduro en condiciones normales (animales Wt) y en condiciones atípicas (sobreexpresión de GSK-3β) (animales Tet/GSK-3β). ?= indica que se desconoce el momento en el que las células dejan de expresar DCX o empiezan adelantadamente la expresión del marcador NeuN.

nocivos para la diferenciación/maduración de los precursores DCX⁺, viéndose afectados tanto aquellos que expresan o acabarán expresando el transgen como aquellos que no.

Recientemente, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios de inyección estereotáxica de retrovirus que expresan GFP, los cuales han aportado nuevos datos en relación a las alteraciones en neurogénesis adulta descritas en este modelo. Así, mediante análisis de Sholl se ha podido determinar que, en los individuos que sobreexpresan GSK-3β, los precursores de dos y tres semanas de edad (momento en el que aún no ha comenzado la

expresión del transgen) poseen un árbol dendrítico más complejo y en conjunto, una morfología más propia de un estado más avanzado de madurez. En puntos temporales posteriores, estas células sin embargo, comienzan a atrofiarse y a degenerar. Integrando esto con los datos presentados en este trabajo, proponemos que los precursores en sus etapas iniciales y, como consecuencia de un ambiente celular alterado, sufrirían una maduración prematura, lo cual estaría de acuerdo con las alteraciones en la expresión del marcador de madurez NeuN. En torno a las cuatro semanas de vida comenzaría la sobreexpresión de GSK-3 β , causando el citado retraso en el apagado de DCX así como el resto de alteraciones descritas en relación a este marcador. A partir de este momento las células, cuyo proceso de diferenciación/maduración ya se encontraba alterado antes del encendido del transgen, sumarían a dichas alteraciones, las provocadas por acción directa de GSK-3 β . Estas células cuya maduración resulta aberrante, no serían capaces de llevar a cabo sus funciones de manera correcta y muchas de ellas acabarían muriendo por apoptosis.

El resultado final sería la disminución significativa en el volumen del GD que es apreciable en los animales Tet/GSK-3 β de avanzada edad y que comporta déficits en la memoria y el aprendizaje. Algo similar a lo propuesto podría estar ocurriendo en los pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer, en los que también se han descrito alteraciones en la neurogénesis adulta. A este respecto conviene destacar que, si bien como se comentó en el [apartado 1.11 de la Introducción](#), los resultados acerca de neurogénesis adulta llevados a cabo en modelos animales de la enfermedad son contradictorios, al menos en lo que a humanos se refiere, nuestros resultados podrían estar de acuerdo con los pocos datos que se tienen hasta ahora sobre este tema. En 2004, Jin y colaboradores pusieron de manifiesto que, en cerebros de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, existía un incremento de algunos de los marcadores típicos de neurogénesis adulta como DCX y PSA-NCAM (Jin *et al.*, 2004b). Posteriormente, en 2006, los mismos autores confirmaron este hecho en un modelo transgénico con acúmulos de placas seniles (Jin *et al.*, 2004a). Aunque de forma genérica consideraron que esto suponía un aumento en el proceso de neurogénesis adulta, estos trabajos no estudiaban en profundidad los procesos de diferenciación/ maduración de los precursores, por lo que no se puede concluir de ellos que el exceso de células positivas para esos marcadores encontrado tanto en humanos como en ratones, se traduzca realmente en un mayor número de nuevas neuronas funcionales. Al contrario, en vista de los resultados presentados en esta tesis, nosotros proponemos que lo que realmente se produce es un fallo en el proceso de formación de las nuevas neuronas.

La implicación de GSK-3 en los procesos de neurogénesis adulta ha sido demostrada en numerosos estudios. Sin embargo, estos trabajos han sido llevados a cabo en modelos de precursores neuronales (NPCs) *in vitro* (Jin *et al.*, 2005; Eom *et al.*, 2007) o bien, en el caso de modelos *in vivo* comentados en mayor detalle en el [apartado 2.4 de la Introducción](#) (Eom y Joep, 2009; Kim *et al.*, 2009b), los estudios se han centrado en los fenómenos de proliferación

sin seguir en detalle el proceso de formación de las nuevas neuronas. En esta tesis se propone, por primera vez, una implicación de GSK-3 β en la diferenciación y maduración de los precursores neuronales en un modelo de ratón que sobreexpresa la proteína, resaltando la importancia de la misma para la correcta consecución del proceso.

Por último, nuestros resultados sugieren que la neurodegeneración y las alteraciones en neurogénesis adulta inducidas por sobreexpresión de GSK-3 β no afectan por igual a las regiones dorsal y ventral del hipocampo. Estos datos permiten especular que quizás estas diferencias podrían existir también entre las regiones posterior y anterior en humanos (dorsal y ventral en ratones respectivamente (Fanselow y Dong, 2010) en relación a GSK-3. Como se comentó con anterioridad, un aumento anómalo en la actividad de GSK-3 se considera clave en el desarrollo de la patogénesis de trastornos de tipo afectivo (Johe y Johnson, 2004) y enfermedades de tipo neurodegenerativo como la enfermedad de Alzheimer (Avila *et al.*, 2004). Centrándose en la enfermedad de Alzheimer, la proteína GSK-3 ha sido propuesta como la principal quinasa capaz de fosforilar tau de manera aberrante (Lovestone *et al.*, 1996; Munoz-Montano *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1999). Formas hiperfosforiladas de la proteína tau no aparecen en GD de humanos hasta los últimos estadios de la enfermedad (Ohm, 2007). Sin embargo, numerosas pruebas ponen de manifiesto que los déficits cognitivos y de memoria aparecen ya en estadios tempranos, demostrando que en esos momentos, el hipocampo ya ha sufrido daños y alteraciones. Además, la pérdida de neuronas en la capa II de la corteza entorrinal también ocurre en las primeras fases de la enfermedad (Gomez-Isla *et al.*, 1996), sugiriendo que todos los cambios en las aferencias que llegan a esta región (como son las procedentes del hipocampo) han tenido importantes consecuencias. Aunque en la actualidad es meramente especulativo el atribuir a la región posterior del hipocampo de humanos las funciones relacionadas con la memoria y el aprendizaje, y a la región anterior aquellos procesos de tipo emocional, como ocurre en ratones, existen datos que ya postulan diferencias funcionales entre ambas regiones (Strange *et al.*, 1999; Pruessner *et al.*, 2001).

En resumen, en esta tesis proponemos que la desregulación de la proteína GSK-3 β provoca alteraciones en la correcta formación de las nuevas neuronas, desembocando esto en un fenómeno neurodegenerativo que, en último término, se traduce en déficits cognitivos y de aprendizaje. Además, hemos demostrado que la neurodegeneración no afecta por igual a las regiones dorsal y ventral del hipocampo, responsables de los procesos de memoria y los comportamientos de tipo emocional respectivamente. Por último, nuestros estudios de reversión han demostrado que las alteraciones descritas en nuestro modelo animal son sólo parcialmente reversibles. Todos estos resultados permiten especular que algo parecido esté sucediendo en la enfermedad de Alzheimer, proponiendo así a GSK-3 como una buena diana

terapéutica para el tratamiento de la misma y resaltando la importancia de un diagnóstico precoz, ya que ciertos daños inducidos por la desregulación en la actividad de la proteína, como la pérdida de precursores neuronales, podrían ser irreversibles a pesar de la posterior inhibición de la enzima.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de GSK-3 β comienza en los precursores neuronales cuatro semanas después de su nacimiento en el modelo transgénico utilizado.
2. De forma directa, la sobreexpresión de GSK-3 β provoca un retraso en el apagado del marcador DCX, lo cual supone que en un determinado punto temporal esto se manifieste mediante la observación de una mayor densidad de estas células y una localización anormal de las mismas en la capa granular. También conduce a alteraciones en el árbol dendrítico de los precursores DCX⁺. Las alteraciones en la diferenciación/maduración de los precursores afectan también al marcador de madurez NeuN, que, en los individuos Tet/GSK-3 β , parece encenderse antes sugiriendo una aceleración en el proceso de maduración.
3. La sobreexpresión de GSK-3 β provoca un aumento en la densidad de células microgliales Iba-1⁺. Esto contribuye a la creación de un entorno inadecuado para la formación de las nuevas neuronas. Los niveles de citoquinas protectoras como la fractalkina, el GM-CSF y el IFN- γ se encuentran disminuidos en los animales transgénicos y se observa un incremento en una citoquina recientemente identificada como perjudicial para la neurogénesis adulta; la eotaxina.
4. Los animales Tet/GSK-3 β presentan una reducción en la densidad de células nestina⁺. El agotamiento de los precursores podría ser consecuencia del ambiente celular atípico.
5. La doxiciclina consigue revertir las alteraciones en la densidad y localización de los precursores DCX⁺, revertir la expresión anómala de los marcadores DCX, CR y NeuN así como recuperar la densidad normal de células Iba-1⁺. Esto sólo ocurre cuando el tratamiento se prolonga durante seis semanas. Por su parte, la doxiciclina no consigue revertir la pérdida de precursores de tipo nestina⁺.
6. El hipocampo dorsal es más susceptible a las alteraciones provocadas por la sobreexpresión de GSK-3 β , lo cual se manifiesta a través de las siguientes observaciones: niveles incrementados de la forma activa de la proteína en esta región, menor densidad de neuronas maduras, aumento de la muerte neuronal en la capa granular (células fractina⁺), atrofia del volumen del GD y aumento en la densidad de astrocitos reactivos. Esto se traduce en alteraciones de tipo cognitivo relacionadas directamente con las funciones de la región dorsal.
7. Los defectos en la densidad y localización de las células DCX⁺ también aparecen en la región ventral, si bien parecen corregirse con la edad explicando, en último término, la ausencia de alteraciones en los comportamientos de tipo ansiedad/depresión relacionados con dicha área hipocámpal.
8. La fosforilación de tau, uno de los principales sustratos de GSK-3 β , tiene lugar durante la diferenciación de los progenitores neuronales y contribuye a conferir la plasticidad necesaria para la migración de los mismos. Por otro lado, la ausencia de tau parece

afectar a la migración de los precursores DCX⁺ pero no a su número. En resumen, la proteína facilita el proceso de neurogénesis adulta.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdipranoto A, Wu S, Stayte S, Vissel B (2008) The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:187-210.
- Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skewir C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS (2003) IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 24:23-40.
- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (2007) Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25:2827-2836.
- Ahmad-Annuar A, Ciani L, Simeonidis I, Herreros J, Fredj NB, Rosso SB, Hall A, Brickley S, Salinas PC (2006) Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J Cell Biol* 174:127-139.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9:723-727.
- Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Penna G, Adorini L (2000) Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 164:1705-1712.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-293.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453:260-264.
- Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P (1991) Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* 1:415-435.
- Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Sartini S, Del Grande P (2000) Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286:21-24.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* 86:582-590.
- Angevine JB, Jr. (1965) Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl* 2:1-70.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Saarma M, Lindvall O (2001) Stroke induces widespread changes of gene expression for glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. *Neuroscience* 106:27-41.
- Avila J (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 580:2922-2927.
- Avila J, Hernandez F (2007) GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 7:1527-1533.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361-384.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140.
- Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C (2011) Fractalkine and CX(3)CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 32:2030-2044.
- Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6:1277-1283.

- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575-579.
- Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *Embo J* 23:2586-2596.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29:450-460.
- Bani-Yaghoub M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK, Smith B, Ribocco-Lutkiewicz M, Kennedy J, Walker PR, Sikorska M (2006) Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* 295:52-66.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonego A (2008) IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb J* 22:2843-2852.
- Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ (1997) Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:683-690.
- Bauer S (2009) Cytokine control of adult neural stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1153:48-56.
- Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrahi-Kol R, Grigoriadis N (2003) Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 24:623-631.
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173-189.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bijur GN, Jope RS (2000) Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75:2401-2408.
- Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14:2415-2419.
- Bilang-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De Carli S, Droste SK, Reul JM (2005) Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *Eur J Neurosci* 22:1691-1700.
- Bilimoria PM, de la Torre-Ubieta L, Ikeuchi Y, Becker EB, Reiner O, Bonni A (2010) A JIP3-regulated GSK3 β /DCX signaling pathway restricts axon branching. *J Neurosci* 30:16766-16776.
- Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN, LaFerla FM (2009) Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13594-13599.
- Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ (2006) Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24:1-14.
- Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T (2009) Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 β and beta-catenin/TCF pathway. *Neuropsychopharmacology* 34:805-815.
- Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A (2009) Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci* 14:540-551.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603-613.
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.
- Brion JP, Octave JN, Couck AM (1994) Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* 63:895-909.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Bullmann T, Hartig W, Holzer M, Arendt T (2010) Expression of the embryonal isoform (0N/3R) of the microtubule-associated protein tau in the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 518:2538-2553.
- Bullmann T, de Silva R, Holzer M, Mori H, Arendt T (2007) Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17:98-102.
- Burwell RD (2000) The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci* 911:25-42.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879-888.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:149-160.
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Cao F, Hata R, Zhu P, Ma YJ, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto K, Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M (2006) Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98:459-470.
- Cardenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I (2005) Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 50:1-6.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917-924.
- Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002) Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606-608.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277:33791-33798.
- Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26.
- Cooper O, Isacson O (2004) Intrastratial transforming growth factor alpha delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *J Neurosci* 24:8924-8931.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
- Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P (1994) The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 303 (Pt 1):21-26.

- Crowder RJ, Freeman RS (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18:2933-2943.
- Cui H, Meng Y, Bulleit RF (1998) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res* 111:177-188.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9023-9027.
- Chadborn NH, Ahmed AI, Holt MR, Prinjha R, Dunn GA, Jones GE, Eickholt BJ (2006) PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J Cell Sci* 119:951-957.
- Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J (2004) Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *Faseb J* 18:1162-1164.
- Chevallier NL, Soriano S, Kang DE, Masliah E, Hu G, Koo EH (2005) Perturbed neurogenesis in the adult hippocampus associated with presenilin-1 A246E mutation. *Am J Pathol* 167:151-159.
- Cho JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278:187-193.
- Cho SH, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L (2011) CX3CR1 Protein Signaling Modulates Microglial Activation and Protects against Plaque-independent Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 286:32713-32722.
- Choi YS, Lee MY, Sung KW, Jeong SW, Choi JS, Park HJ, Kim ON, Lee SB, Kim SY (2003) Regional differences in enhanced neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats after transient forebrain ischemia. *Mol Cells* 16:232-238.
- Chojnacki A, Shimazaki T, Gregg C, Weinmaster G, Weiss S (2003) Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 23:1730-1741.
- Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK (1996) Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem* 271:30847-30857.
- D'Orlando C, Celio MR, Schwaller B (2002) Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. *Brain Res* 945:181-190.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721-732.
- Das S, Basu A (2008) Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res* 86:1199-1208.
- Datta SR, Dudek H., Tao X., Masters S., Fu, HA., Gotoh, Y., Greenberg, ME. (1998) Molecular mechanisms of neuronal survival and apoptosis. In: *Hormones signaling* (B OM, ed), pp 257-306. San Diego: Academic Press.
- Davila D, Piriz J, Trejo JL, Nunez A, Torres-Aleman I (2007) Insulin and insulin-like growth factor I signalling in neurons. *Front Biosci* 12:3194-3202.
- Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G (1998) Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm* 105:317-327.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.
- Dayanandan R, Van Slegtenhorst M, Mack TG, Ko L, Yen SH, Leroy K, Brion JP, Anderton BH, Hutton M, Lovestone S (1999) Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett* 446:228-232.

- Del Rio JA, Gonzalez-Billault C, Urena JM, Jimenez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas M, Simo S, La Torre A, Wandosell F, Avila J, Soriano E (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* 14:840-850.
- DePaoli-Roach AA (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 y casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem* 259:12144-12152.
- Doetsch F, Hen R (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15:121-128.
- Dominguez I, Itoh K, Sokol SY (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8498-8502.
- Dominguez MI, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ (2003) Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966:206-217.
- Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG (2004) Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127:601-609.
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW (2001) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38:192-246.
- Dong HWyS, L.W (2006) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine/autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol* 494:142-178.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141-1154.
- Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann N Y Acad Sci* 466:257-268.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130:1146-1158.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710-713.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006a) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26:5083-5090.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F (2006b) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27:1258-1268.

- Eom TY, Jope RS (2009) Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α /3 β impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry* 66:494-502.
- Eom TY, Roth KA, Jope RS (2007) Neural precursor cells are protected from apoptosis induced by trophic factor withdrawal or genotoxic stress by inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* 282:22856-22864.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ermini FV, Grathwohl S, Radde R, Yamaguchi M, Staufenbiel M, Palmer TD, Jucker M (2008) Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* 172:1520-1528.
- Fan XT, Xu HW, Cai WQ, Yang H, Liu S (2004) Antisense Noggin oligodeoxynucleotide administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 366:107-111.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12:895-908.
- Feng Y, Walsh CA (2001) Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* 2:408-416.
- Ferland RJ, Gross RA, Applegate CD (2002) Differences in hippocampal mitotic activity within the dorsal and ventral hippocampus following flurothyl seizures in mice. *Neurosci Lett* 332:131-135.
- Ferreira A, Lu Q, Orecchio L, Kosik KS (1997) Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A β . *Mol Cell Neurosci* 9:220-234.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131:3805-3819.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.
- Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC (2002) The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J Biol Chem* 277:43844-43848.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23:247-256.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F (2003) Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* 13:620-626.
- Gama Sosa MA, Wen PH, De Gasperi R, Perez GM, Senturk E, Friedrich VL, Jr., Elder GA (2004) Entorhinal cortex lesioning promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neuroscience* 127:881-891.
- Gan L, Qiao S, Lan X, Chi L, Luo C, Lien L, Yan Liu Q, Liu R (2008) Neurogenic responses to amyloid- β plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Neurobiol Dis* 29:71-80.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Garcia-Segura LM (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20:705-712.

- Garcia-Segura LM (2009) Hormones and brain plasticity. Nueva York: Oxford University Press.
- Garcia-Segura LM, Wise PM (2000) Introduction to the special issue on neuroprotection by steroids: new perspectives. *J Neurocytol* 29:305-306.
- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581:1579-1586.
- Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapir T, Sapoznik S, Fishler Y, Azoulai D, Reiner O (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *Embo J* 23:823-832.
- Glasper ER, Llorens-Martin MV, Leuner B, Gould E, Trejo JL (2010) Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus* 20:706-712.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92:63-72.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, *et al.* (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8:393-399.
- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P (1995) Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 65:2804-2807.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16:4491-4500.
- Gomez de Barreda E, Perez M, Gomez Ramos P, de Cristobal J, Martin-Maestro P, Moran A, Dawson HN, Vitek MP, Lucas JJ, Hernandez F, Avila J (2010) Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 37:622-629.
- Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2007) N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* 282:22406-22413.
- Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124:769-782.
- Gould E (1994) The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth y survival. *Ann N Y Acad Sci* 743:73-92; discussion 92-73.
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ (1999) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3:186-192.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391-426.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.
- Guzman-Marin R, Bashir T, Suntsova N, Szymusiak R, McGinty D (2007) Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience* 148:325-333.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10896-10901.

- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Haughey NJ, Liu D, Nath A, Borchard AC, Mattson MP (2002a) Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 1:125-135.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP (2002b) Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83:1509-1524.
- He P, Shen Y (2009) Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:6545-6557.
- He X, Saint-Jeannet JP, Woodgett JR, Varmus HE, Dawid IB (1995) Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature* 374:617-622.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106:348-360.
- Henke PG (1990) Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res Bull* 25:691-695.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1201-1213.
- Hernandez F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529-1533.
- Hernandez F, Perez M, Lucas JJ, Mata AM, Bhat R, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:3801-3806.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.
- Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 272:25326-25332.
- Hong XP, Peng CX, Wei W, Tian Q, Liu YH, Cao FY, Wang Q, Wang JZ (2011) Relationship of adult neurogenesis with tau phosphorylation and GSK-3 β activity in subventricular zone. *Neurochem Res* 36:288-296.
- Hong XP, Peng CX, Wei W, Tian Q, Liu YH, Yao XQ, Zhang Y, Cao FY, Wang Q, Wang JZ (2010) Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20:1339-1349.
- Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET (2008) The Wnt pool of glycogen synthase kinase 3 β is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Mol Cell Biol* 28:1515-1527.
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (2007) Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25:81-86.
- Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2719-2723.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J* 12:803-808.
- Hunsaker MR, Kesner RP (2008) Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem* 89:61-69.

- Huttmann K, Sadgrove M, Wallraff A, Hinterkeuser S, Kirchhoff F, Steinhauser C, Gray WP (2003) Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 18:2769-2778.
- Imahori K, Uchida T (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem* 121:179-188.
- Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett* 148:202-206.
- Itoh T, Satou T, Hashimoto S, Ito H (2005) Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *Neuroreport* 16:1687-1691.
- Jacobowitz DM, Winsky L (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 304:198-218.
- Janke C, Beck M, Stahl T, Holzer M, Brauer K, Bigl V, Arendt T (1999) Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders. *Brain Res Mol Brain Res* 68:119-128.
- Jayatissa MN, Henningsen K, Nikolajsen G, West MJ, Wiborg O (2010) A reduced number of hippocampal granule cells does not associate with an anhedonia-like phenotype in a rat chronic mild stress model of depression. *Stress* 13:95-105.
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120:123-135.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA (2004a) Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13363-13367.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004b) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343-347.
- Jin L, Hu X, Feng L (2005) NT3 inhibits FGF2-induced neural progenitor cell proliferation via the PI3K/GSK3 pathway. *J Neurochem* 93:1251-1261.
- Jinno S (2011) Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 519:451-466.
- Jinno S, Kosaka T (2010) Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 20:829-840.
- Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* 13:413-427.
- Jonkers J, Korswagen HC, Acton D, Breuer M, Berns A (1997) Activation of a novel proto-oncogene, *Frat1*, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *EMBO J* 16:441-450.
- Joep RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95-102.
- Joep RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32:577-595.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16:182-187.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97-105.
- Kempermann G (2006) Adult neurogenesis: Oxford University Press.
- Kempermann G (2008) The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* 31:163-169.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.

- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52:135-143.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004a) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186-191.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004b) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kiefer JC (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* 236:2356-2366.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS, Son H (2004) Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo. *J Neurochem* 89:324-336.
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009a) Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284:31052-31061.
- Kim L, Kimmel AR (2006) GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr Drug Targets* 7:1411-1419.
- Kim WY, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR, Snider WD (2009b) GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci* 12:1390-1397.
- Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD (2006) Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981-996.
- Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A (2007) Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *Embo J* 26:5143-5152.
- Kirschenbaum B, Nedergaard M, Preuss A, Barami K, Fraser RA, Goldman SA (1994) In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex* 4:576-589.
- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, Sasai Y (2000a) Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127:791-800.
- Kishi T, Tsumori T, Ono K, Yokota S, Ishino H, Yasui Y (2000b) Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 419:205-222.
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-8459.
- Knowles R, LeClerc N, Kosik KS (1994) Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 28:256-264.
- Kohler SJ, Stanton GB, Cameron JL, Greenough WT. (2011) Maturation time of new granule cells in the dentate gyrus of adult macaque monkeys exceeds six months. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10326-10331.
- Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 13:127-132.
- Kolecki R, Lafauci G, Rubenstein R, Mazur-Kolecka B, Kaczmarek W, Frackowiak J (2008) The effect of amyloidosis-beta and ageing on proliferation of neuronal progenitor cells in APP-transgenic mouse hippocampus and in culture. *Acta Neuropathol* 116:419-424.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G (2002) GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:13-25.

- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455-463.
- Kruger C, Laage R, Pitzer C, Schabitz WR, Schneider A (2007) The hematopoietic factor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promotes neuronal differentiation of adult neural stem cells in vitro. *BMC Neurosci* 8:88.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA (1999) Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156:333-344.
- Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T (1994) The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120:2637-2649.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6:21-27.
- Larcher JC, Boucher D, Ginzburg I, Gros F, Denoulet P (1992) Heterogeneity of Tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons. *Dev Biol* 154:195-204.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H (2010) When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 33: 569-79.
- Lauro C, Di Angelantonio S, Cipriani R, Sobrero F, Antonilli L, Brusadin V, Ragozzino D, Limatola C (2008) Activity of adenosine receptors type 1 is required for CX3CL1-mediated neuroprotection and neuromodulation in hippocampal neurons. *J Immunol* 180:7590-7596.
- Leroy K, Brion JP (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 β in rat brain. *J Chem Neuroanat* 16:279-293.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later. *Biosci Rep* 7:681-699.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, *et al.* (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.
- Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* 18:4233-4240.
- Li T, Hawkes C, Qureshi HY, Kar S, Paudel HK (2006) Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3 β . *Biochemistry* 45:3134-3145.
- Li Y, Mu Y, Gage FH (2009) Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr Top Dev Biol* 87:149-174.
- Liang J, Slingerland JM (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339-345.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778.
- Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ (2003) Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem* 87:1333-1344.
- Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2007) Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229-240.
- LoTurco J (2004) Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron* 41:175-177.
- Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 β in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73:1145-1157.

- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, *et al.* (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4:1077-1086.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20:27-39.
- Lukas W, Jones KA (1994) Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 61:307-316.
- Luo Y, Shan G, Guo W, Smrt RD, Johnson EB, Li X, Pfeiffer RL, Szulwach KE, Duan R, Barkho BZ, Li W, Liu C, Jin P, Zhao X (2010) Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS Genet* 6:e1000898.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2006) Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus* 16:480-490.
- Llorens-Martin MV, Rueda N, Martinez-Cue C, Torres-Aleman I, Florez J, Trejo JL (2007) Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience* 147:631-638.
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283:9359-9368.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH (2009) Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* 136:1017-1031.
- Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15:7548-7564.
- Maren S, Holt WG (2004) Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behav Neurosci* 118:97-110.
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24:1726-1733.
- Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C (2005) Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 49:355-366.
- McKeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L (1997) A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:798-805.
- Menezes JR, Smith CM, Nelson KC, Luskin MB (1995) The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci* 6:496-508.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9:729-731.
- Meyer G, Perez-Garcia CG, Gleeson JG (2002) Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12:1225-1236.
- Miller RJ, Rostene W, Apartis E, Banisadr G, Biber K, Milligan ED, White FA, Zhang J (2008) Chemokine action in the nervous system. *J Neurosci* 28:11792-11795.

- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Minturn JE, Geschwind DH, Fryer HJ, Hockfield S (1995) Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein. *J Comp Neurol* 355:369-379.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*.
- Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697-9701.
- Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG, Denton RM (1997) Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 272:7713-7719.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Munoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 411:183-188.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 14:629-644.
- Nacher J, Blasco-Ibanez JM, McEwen BS (2002) Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 930:1-11.
- Nagy Z, Esiri MM, Smith AD (1997) Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol* 93:294-300.
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2007) Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* 25:649-658.
- Neve RL, Selkoe DJ, Kurnit DM, Kosik KS (1986) A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res* 387:193-196.
- Niidome T, Taniuchi N, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2008) Differential regulation of neurogenesis in two neurogenic regions of APPswe/PS1dE9 transgenic mice. *Neuroreport* 19:1361-1364.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.
- Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahl-
janian M, Lau LF, Duff K (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38:555-565.
- Ohm TG (2007) The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163:723-740.
- Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL (2006) Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J Neurosci* 26:4095-4103.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273:19929-19932.
- Pap M, Cooper GM (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22:578-586.
- Paxinos G, Franklin B. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Science, USA.

- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1010-1019.
- Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (2008) The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S428-437.
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β . *Neuron* 53:703-717.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38:247-289.
- Pevalova M, Filipcik P, Novak M, Avila J, Iqbal K (2006) Post-translational modifications of tau protein. *Bratisl Lek Listy* 107:346-353.
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391.
- Pivneva TA (2008) Microglia in normal condition and pathology. *Fiziol Zh* 54:81-89.
- Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* 1114:147-162.
- Price DL, Sisodia SS (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21:479-505.
- Pruessner JC, Collins DL, Pruessner M, Evans AC (2001) Age and gender predict volume decline in the anterior and posterior hippocampus in early adulthood. *J Neurosci* 21:194-200.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.
- Qiu L, Zhu C, Wang X, Xu F, Eriksson PS, Nilsson M, Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG, Blomgren K (2007) Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:785-794.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Rakic P, Nowakowski RS (1981) The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 196:99-128.
- Rami A, Brehier A, Thomasset M, Rabie A (1987) Cholecalciferol (28-kDa calcium-binding protein) in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study. *Dev Biol* 124:228-238.
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234-246.
- Rao MS, Hattiangady B, Shetty AK (2006) The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging Cell* 5:545-558.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Rhodes JS, van Praag H, Jeffrey S, Girard I, Mitchell GS, Garland T, Jr., Gage FH (2003) Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behav Neurosci* 117:1006-1016.
- Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR (2003) Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 183:406-417.

- Riddle DRyL, R.J (2007) Neurogenesis in the Adult and Aging Brain. In: Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms (DR R, ed). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Roberts AC, Tomic DL, Parkinson CH, Roeling TA, Cutter DJ, Robbins TW, Everitt BJ (2007) Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): an anterograde and retrograde tract-tracing study. *J Comp Neurol* 502:86-112.
- Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Alford M, Windisch M, Moessler H, Masliah E (2002) Effects of Cerebrolysin on amyloid-beta deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*:327-336.
- Rodriguez JJ, Jones VC, Verkhratsky A (2009) Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. *Neuroreport* 20:907-912.
- Rodriguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A (2008) Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3:e2935.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, *et al.* (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778.
- Rogers JL, Kesner RP (2006) Lesions of the dorsal hippocampus or parietal cortex differentially affect spatial information processing. *Behav Neurosci* 120:852-860.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272:1023-1026.
- Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Rougon G, Goridis C (1983) Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 304:347-349.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61:133-168.
- Saravia F, Beauquis J, Pietranera L, De Nicola AF (2007) Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology* 32:480-492.
- Saunders RC, Rosene DL, Van Hoesen GW (1988) Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *J Comp Neurol* 271:185-207.
- Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK (2004) Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* 41:203-213.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192:348-356.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159:149-175.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Scholzen TyG, J (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182:311-322.
- Schwamborn J, Lindecke A, Elvers M, Horejschi V, Kerick M, Rafigh M, Pfeiffer J, Prullage M, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2003) Microarray analysis of tumor necrosis factor alpha induced gene expression in U373 human glioblastoma cells. *BMC Genomics* 4:46.

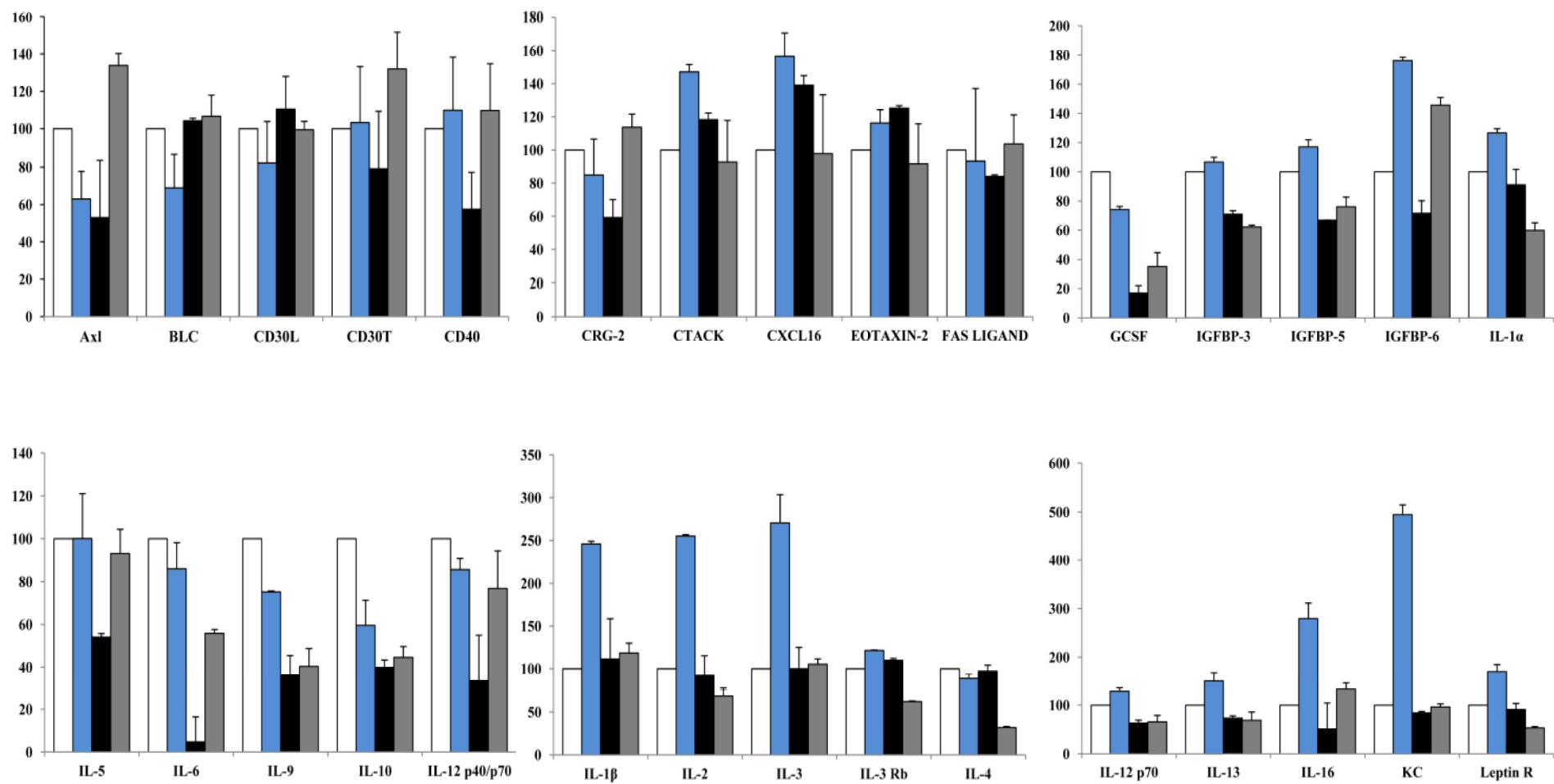
- Seki T (2002) Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res* 70:327-334.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 167:99-105.
- Sennvik K, Boekhoorn K, Lasrado R, Terwel D, Verhaeghe S, Korr H, Schmitz C, Tomiyama T, Mori H, Krugers H, Joels M, Ramakers GJ, Lucassen PJ, Van Leuven F (2007) Tau-4R suppresses and promotes neuronal differentiation in the hippocampus of tau knockin/knockout mice. *Faseb J* 21:2149-2161.
- Sequier JM, Hunziker W, Richards G (1988) Localization of calbindin D28 mRNA in rat tissues by in situ hybridization. *Neurosci Lett* 86:155-160.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Shan X, Chi L, Bishop M, Luo C, Lien L, Zhang Z, Liu R (2006) Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells* 24:1280-1287.
- Shea TB, Beermann ML, Nixon RA, Fischer I (1992) Microtubule-associated protein tau is required for axonal neurite elaboration by neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 32:363-374.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN (2004) APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14:2025-2032.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.
- Shruster A, Melamed E, Offen D (2010) Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. *Apoptosis* 15:1415-1421.
- Sirerol-Piquer M, Gomez-Ramos P, Hernandez F, Perez M, Moran MA, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J, Garcia-Verdugo JM (2011) GSK3 β overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus. *Hippocampus* 21:910-922.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Song JH, Wang CX, Song DK, Wang P, Shuaib A, Hao C (2005) Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* 280:12896-12901.
- Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109 (Pt 1):143-153.
- Stefanis L, Burke RE, Greene LA (1997) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 10:299-305.
- Steiner B, Wolf S, Kempermann G (2006) Adult neurogenesis and neurodegenerative disease. *Regen Med* 1:15-28.
- Strange BA, Fletcher PC, Henson RN, Friston KJ, Dolan RJ (1999) Segregating the functions of human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4034-4039.

- Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG (2004) Radial glia-like cells at the base of the lateral ventricles in adult mice. *J Neurocytol* 33:153-164.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296 (Pt 1):15-19.
- Swanson LW, Köhler, C and Bjorklund, A (1987) The Septohippocampal System. In: *The Limbic Region*: Amsterdam: Elsevier.
- Swanson LW and C, W.M (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49-84.
- Takagi N, Cheung HH, Bissoon N, Teves L, Wallace MC, Gurd JW (1999) The effect of transient global ischemia on the interaction of Src and Fyn with the N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic densities: possible involvement of Src homology 2 domains. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:880-888.
- Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, Fujita SC, Imahori K (1994) Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem* 63:245-255.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7789-7793.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203:33-36.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9637-9641.
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150:989-1000.
- Takuma H, Arawaka S, Mori H (2003) Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res Dev Brain Res* 142:121-127.
- Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 85:352-370.
- Taniuchi N, Niidome T, Goto Y, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2007) Decreased proliferation of hippocampal progenitor cells in APPswe/PS1dE9 transgenic mice. *Neuroreport* 18:1801-1805.
- Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett* 458:247-251.
- Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T (1993) Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11:1163-1174.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305-33312.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21:1628-1634.
- Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37:402-411.
- Uittenbogaard M, Chiaramello A (2002) Constitutive overexpression of the basic helix-loop-helix Nex1/MATH-2 transcription factor promotes neuronal differentiation of PC12 cells and neurite regeneration. *J Neurosci Res* 67:235-245.
- Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT (1995) Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* 49:23-36.

- van Groen T, Wyss JM (1990) The connections of presubiculum and parasubiculum in the rat. *Brain Res* 518:227-243.
- Van Kampen JM, Eckman CB (2006) Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* 26:7272-7280.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999a) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999b) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13427-13431.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034
- Verina T, Rohde CA, Guilarte TR (2007) Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. *Neuroscience* 145:1037-1047.
- Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C (2007) Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 27:6771-6780.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Despres S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90-94.
- Welsh GI, Proud CG (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 294 (Pt 3):625-629.
- Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, Younkin LH, DeGasperi R, Gama Sosa MA, Robakis NK, Haroutunian V, Elder GA (2004) The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol* 188:224-237.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Widera D, Holtkamp W, Entschladen F, Niggemann B, Zanker K, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2004) MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* 83:381-387.
- Wiltout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R (2007) Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int* 50:1028-1041.
- Witter M and Amaral, DG (2004) Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 635-704. Amsterdam: Elsevier.
- Witter MP, Groenewegen HJ (1990) The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog Brain Res* 83:47-58.
- Wong G, Goldshmit Y, Turnley AM (2004) Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol* 187:171-177.
- Wood HB, Episkopou V (1999) Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev* 86:197-201.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9:2431-2438.
- Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol* 92:232-241.

- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K (2000) Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11:1991-1996.
- Yamasaki TR, Blurton-Jones M, Morrisette DA, Kitazawa M, Oddo S, LaFerla FM (2007) Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss. *J Neurosci* 27:11925-11933.
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267:2003-2006.
- Yoshimi K, Ren YR, Seki T, Yamada M, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Murayama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H (2005) Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 58:31-40.
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (2005) GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120:137-149.
- Yu Y, Run X, Liang Z, Li Y, Liu F, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem* 108:1480-1494.
- Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R (2007) Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 204:77-87.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7925-7930.
- Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42:897-912.
- Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 27:12211-12220.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis y spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268-275.

ANEXO I



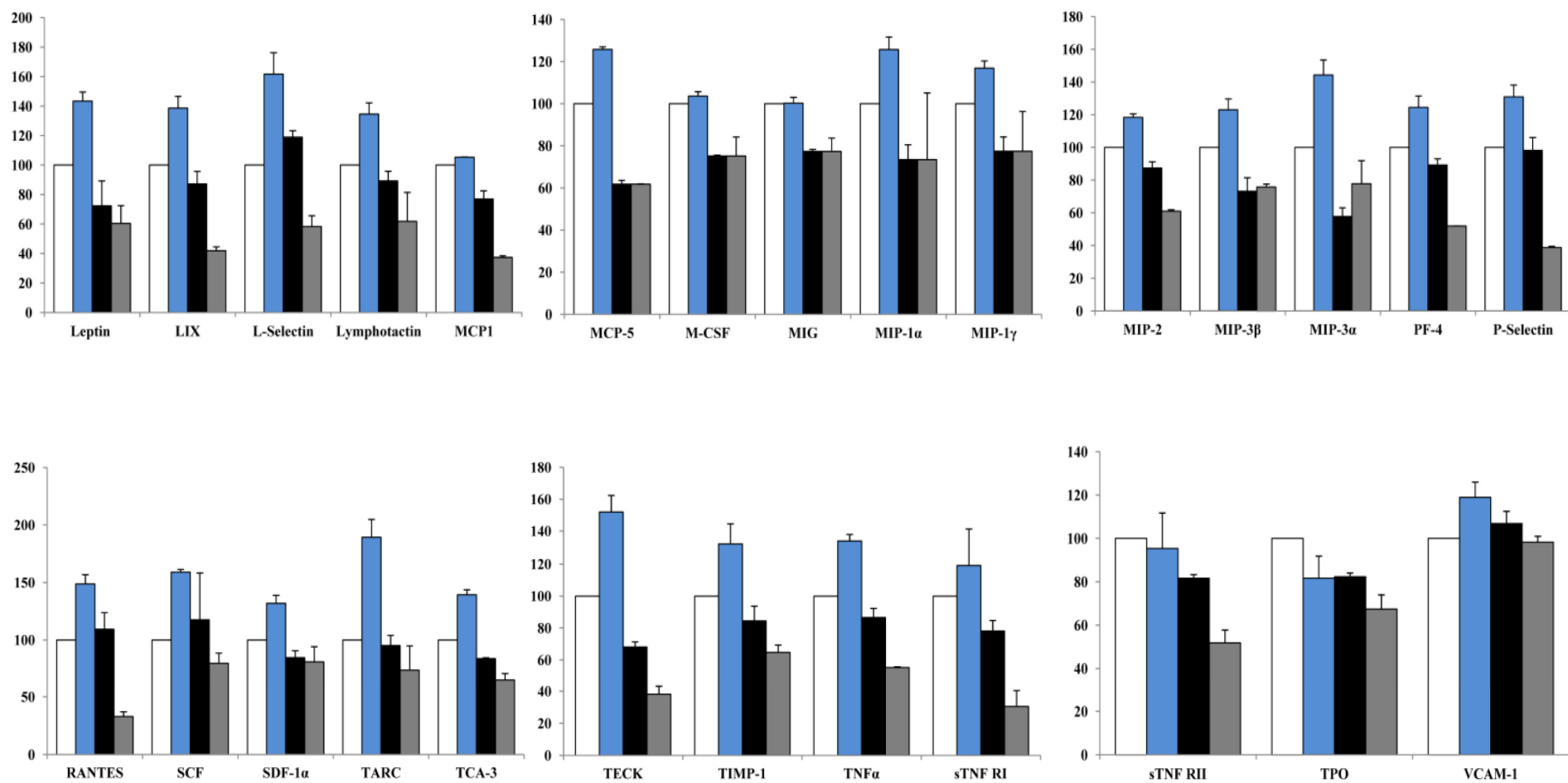


Figura Anexo I. Resultado del ensayo de inmunodetección de citoquinas (array). Representación gráfica de los niveles de todas las citoquinas analizadas normalizados por el control interno y expresados como porcentajes respecto los valores obtenidos para los controles Wt (asignados como 100 %). Cada valor es el resultado de la media de dos réplicas. Barras blancas = Wt ; barras azules = Wt doxy ; barras negras = Tet/GSK-3β control ; barras grises = Tet/GSK-3β doxy. (Fractalk.= fractalkina).

ANEXO II



Function of tau protein in adult newborn neurons

Almudena Fuster-Matanzo^a, Elena Gómez de Barreda^a, Hana N. Dawson^b, Michael P. Vitek^b,
Jesús Avila^{a,c}, Félix Hernández^{a,*}

^aCentro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bDivision of Neurology, Duke University, Durham, NC 27710, USA

^cCentro de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2009

Revised 10 August 2009

Accepted 11 August 2009

Available online 18 August 2009

Edited by Ned Mantei

Keywords:

Neurogenesis

Tau

Doublecortin

ABSTRACT

Levels of tau phosphorylation are high during the developmental period of intense neurite outgrowth, but decrease later. We here investigated whether tau protein plays a role in adult neurogenesis. First we demonstrate that new neurons generated in the subgranular zone express tau in a hyperphosphorylated form. Phospho-tau expression colocalized with doublecortin but not with glial fibrillary acidic protein, Ki67 or calbindin. The same was observed in the subventricular zone. Tau knockout mice did not show a significant decrease in the number of doublecortin-positive cells, although a deficit in migration was observed. These findings suggest that basal tau phosphorylation present in adult animals is in part due to neurogenesis, and from Tau knockout mice it seems that tau is involved in normal migration of new neurons.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The subventricular zone (SVZ) bordering the lateral ventricles, and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal formation are two brain regions where neurogenesis takes place in adult mammals. In the hippocampus, newly differentiated granule cells grow dendrites into the molecular layer, and send axons into the CA3 region. Major glutamatergic synaptic activation from perforant path afferents does not occur until new neurons are two or more weeks old. It coincides with appearance of spines on dendrites of newly born neurons [1]. Within 4–6 weeks after birth these neurons become fully integrated into the circuit [2].

Tau is a neuronal microtubule-associated protein that stabilizes neuronal microtubules under normal physiological conditions. Tau plays a key role in the morphogenesis of neurons. The human tau gene contains 16 exons, from which different tau isoforms are generated by alternative splicing [3,4]. Some of these isoforms are selectively expressed during embryonic and early postnatal development [4–6], whereas in the adult central nervous system six different tau isoforms are expressed that differ in the presence or absence of exons 2, 3, and 10 [7]. Exon 10 encodes one of the four repeat sequences [7,8] that form the microtubule-binding domain [9]. The presence of exon 10 results in tau with four repeat micro-

tubule-binding sequences (4R), whereas the alternatively spliced isoforms without exon 10 have only three of these sequences (3R). The expression of some of these tau isoforms is developmentally regulated. Thus, isoforms lacking exon 10 (Tau 3R) are found at early developmental stages whereas tau isoforms containing exon 10 (Tau 4R) are mainly found in neurons at mature developmental stages [10]. In adult human brain both Tau 3R and Tau 4R are present, although in newborn neurons such as those in the hippocampal dentate gyrus Tau 3R is the main isoform [11]. In addition to the presence or absence of exon 10, the phosphorylation of tau is developmentally regulated: it is higher in fetal neurons and decreases with age during development [12–14]. Furthermore, a huge increase in the phosphorylation of tau arises in pathological situations (tauopathies such as Alzheimer's disease) [5,15]. However, fetal-tau phosphorylation can also be observed in the adult. In this work, we have studied the presence of tau phosphorylated in the fetal epitope PHF-1 in adult mice. Our results indicate that phosphorylated tau is mainly localized in newborn neurons. In addition, the analysis of Tau knockout mice (Tau-KO) suggests that tau protein is involved in normal migration of new neurons generated from the subgranular zone.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Generation of the mouse line Tau-KO has been previously described [16]. Tau-KO as well as wild-type mice (C57BL/6) were

Abbreviations: SGZ, subgranular zone; SVZ, subventricular zone; DCX, doublecortin; GFAP, glial fibrillary acidic protein

* Corresponding author. Fax: +34 911964420.

E-mail address: fhernandez@cbm.uam.es (F. Hernández).

bred at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, Spain). Four to five mice were housed per cage with food and water available *ad libitum*. Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12 h light–dark cycle with light onset at 07:00 h. One month-old mice were used in this study. All animal care was in accordance with institutional guidelines.

2.2. Antibodies

The following anti-tau antibodies were used: PHF-1 (from Dr. Peter Davies, NY, USA) recognizes serines 396 and 404 when they are phosphorylated, AT-8 (from 2 Innogenetics, Gent, Belgium) and 12e8 (a kind gift of Dr. P. Seubert, Athena, San Francisco, CA, USA) antibodies recognize serines 202 and 262, respectively, when they are phosphorylated, and 7.51 antibody (from Dr. Claude Wischik, UK) recognizes segments of the last two repeats within the microtubule-binding domain of tau in a phosphorylation-independent manner [17] and detects all soluble tau isoform in Western blot analysis. Sources of other commercial antibodies were: a polyclonal goat anti-DCX (1:500, C-18, Santa Cruz Laboratories), polyclonal anti-GFAP (PharMingen), polyclonal rabbit anti-calbindin (Millipore), polyclonal rabbit anti-nuclear Ki-67 (Novocastra) and monoclonal anti- α -tubulin (Sigma).

2.3. Western blot analysis

Forebrain extracts for Western blot analysis were prepared from mice at various ages in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM EDTA and protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml pepstatin). The samples were homogenized at 4 °C and protein content determined by the Bradford method (Bio-Rad). Total protein (10 μ g) was electrophoresed on 10% SDS–PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). After blocking, blots were incubated with primary antibodies PHF-1 (1/200), 7.51 (1/500) and α -tubulin (1/2000) at 4 °C overnight in 5% nonfat dried milk. A secondary goat anti-mouse (1/5000; GIBCO) followed by ECL detection reagents (Amersham) was used for immunodetection.

2.4. Immunohistochemistry and immunofluorescence

Mice were anaesthetized with a xylazine/ketamine solution, and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in Sorensen's buffer for 10 min. Brains were postfixed in 4% PFA for 2 h at 4 °C and cryoprotected in 30% sucrose solution. Thirty

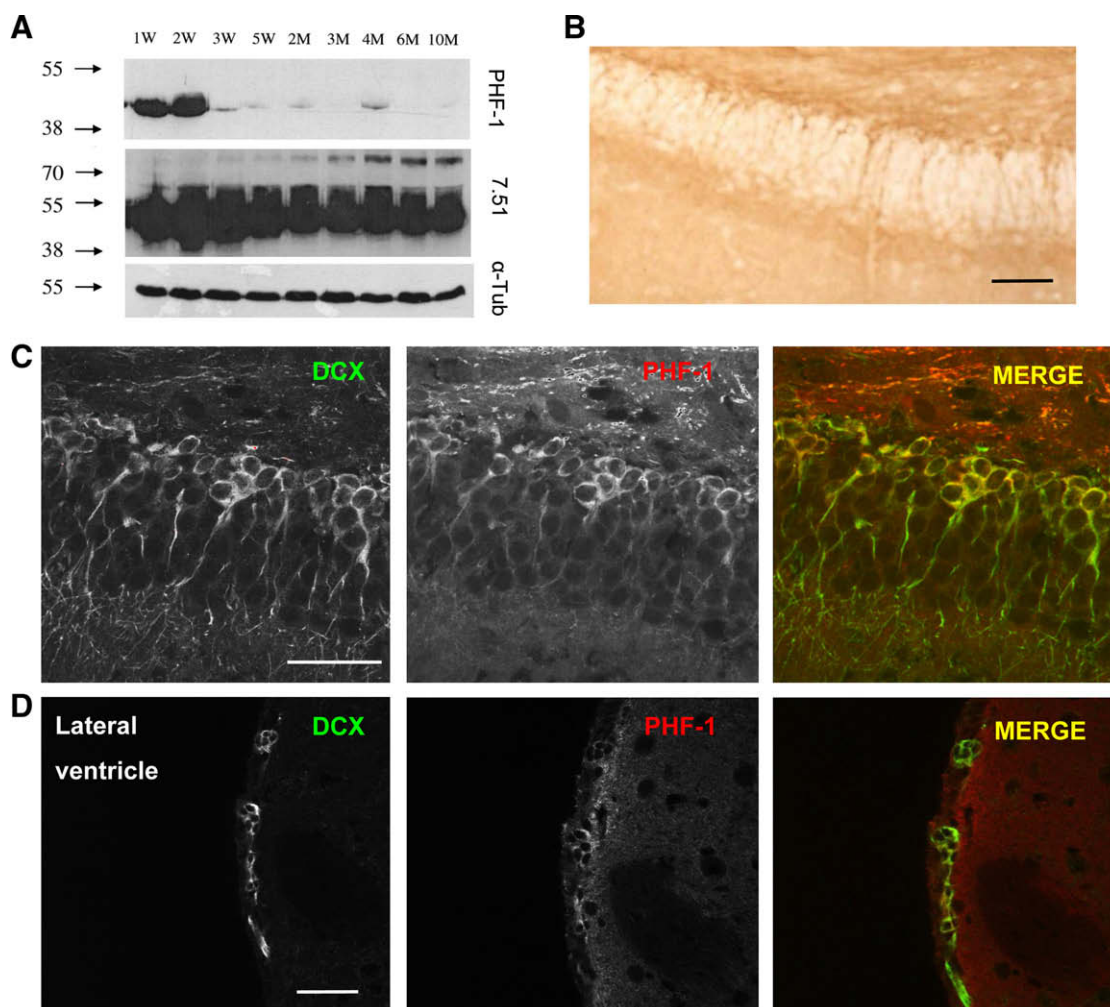


Fig. 1. Phosphorylated tau is present in DCX-positive cells in the SGZ of the hippocampus and in the SVZ. (A) Extracts were prepared from mouse brains at various developmental stages as described in Section 2. Samples were electrophoresed, blotted, and probed with antibodies PHF-1, 7.51 and α -tubulin. (B) PHF-1 immunostaining of the dentate gyrus. Positive cells are found in the SGZ. (C and D) Hippocampal sections double-labeled with anti-DCX (green) and PHF-1 (red) show colocalization of both in the SGZ (C) and SVZ (D). Scale bar = 50 μ m in (C) and 75 μ m in (B and D).

micrometer sagittal sections were cut on a freezing microtome (Leica) and collected in 0.1% azide-PBS solution. Next, brain sections were pretreated for 1 h with 1% BSA, 5% FBS and 0.2% Triton X-100, and then incubated with PHF-1 (1/100) for 1 h. Finally, brain sections were incubated in avidin–biotin complex using the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (DAB; Sigma) and 0.003% H₂O₂ for 10 min. Sections were coverslipped with Fluorosave (Calbiochem; La Jolla, CA, USA).

Immunofluorescence analysis was performed with sagittal mouse brain sections pretreated with NH₄Cl 50 mM, glycine 1 M, BSA 1%, and Triton X-100 1% in PBS buffer, and incubated with primary antibodies. For colocalization studies, sections were simultaneously labeled with goat anti-DCX (1/150) and PHF-1 (1/100), AT-8 (1/100), or 12e8 (1/100) for 1 h. Tissue was washed and placed in secondary antibody solution: 1:1000 biotinylated anti-goat IgG (Vectastain Elite ABC Kit Goat IgG, Vector Laboratories), in 0.1 M PBS for 1 h at room temperature. Tissue was washed and placed in 1:500 streptavidin–Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes) for 45 min at room temperature and secondary antibody goat anti-mouse IgG labeled with Texas Red or donkey anti-mouse IgG labeled with Alexa 555. Colocalization studies were performed with PHF-1 antibody and anti-GFAP (1:400), anti-Ki67 (1:500), or anti-calbindin (1/500). In this case, secondary antibodies were goat anti-mouse Texas Red and anti-rabbit Oregon green. Colocalization of two markers was analyzed by taking successive Oregon green 488 and Texas Red fluorescent images using an Axioskop 2 plus microscope and a CCD camera (Coolsnap FX color).

2.5. Quantification of migration of doublecortin-positive cells

Confocal sections of individual DCX-positive cells (wild-type = 61, Tau-KO = 83) were reconstructed from confocal z stacks

by using the program ImageJ. Cells migrating more than 13.38 μ m from the SGZ were quantified. The results were divided among the number of total DCX-positive cells present in the section.

3. Results

3.1. Phosphorylated tau colocalizes with markers of neuronal differentiation in the dentate gyrus and subventricular zone

Phosphorylated forms of tau protein recognized by antibody PHF-1 are at their highest levels around the second postnatal week and then decline [13,14]. However, reactivity with PHF-1 was still detectable by Western blotting in adult mice (Fig. 1A). When we tried to identify the brain area where the phosphorylated protein was localized, we observed immunoreactivity with antibody PHF-1 in cells of the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (Fig. 1B). Taking into account that the SGZ is an area where neurogenesis takes place in adult animals, we stained hippocampal sections with antibodies recognizing antigens used as markers of neurogenesis. We first found colocalization with doublecortin (DCX), a marker of early neuronal differentiation (Fig. 1C). PHF-1 staining was mainly concentrated in the somatic compartment, while the DCX signal was also found in the apical dendrite. The same was observed in the other brain area with active neurogenesis, the SVZ (Fig. 1D).

On the other hand, we found no colocalization of staining for the PHF-1 epitope and the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Fig. 2A). Fig. 2B shows that the lack of colocalization of PHF-1 staining with Ki-67, a nuclear marker of proliferating cells. In addition, we observed no colocalization of PHF-1 staining with that for calbindin (Fig. 2C), a protein expressed in mature neurons. Thus, in the SGZ the pattern of colocalization detected in SGZ between phosphorylated tau and other markers of neuronal

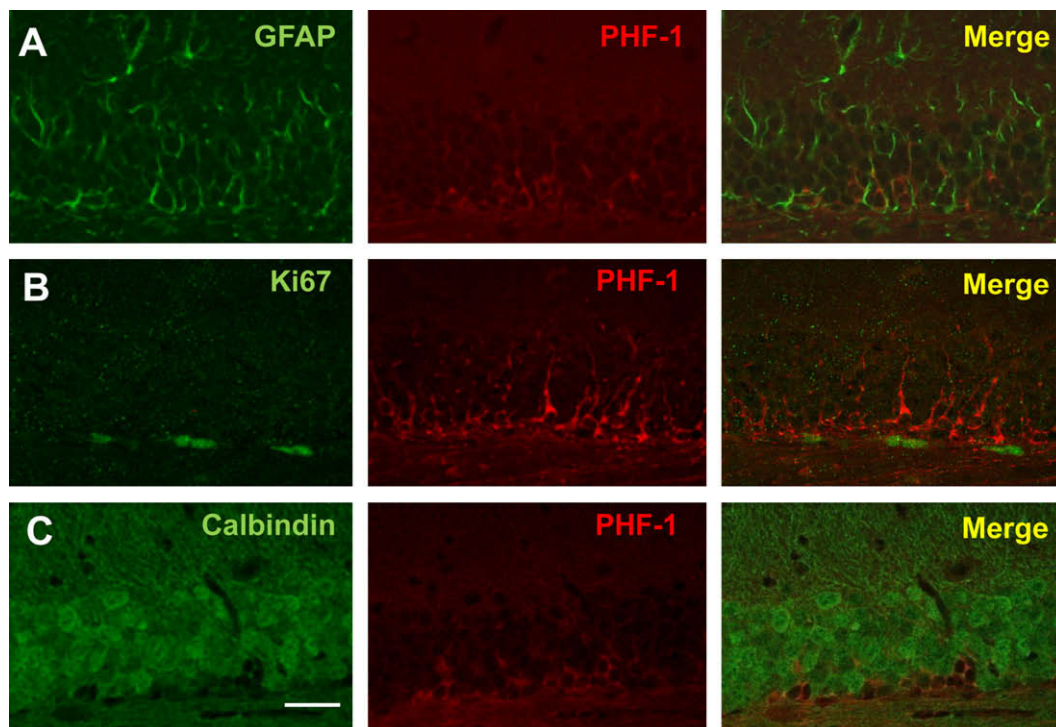


Fig. 2. Phospho-tau protein does not colocalize with GFAP, Ki-67 or calbindin-positive cells. Representative colabeling of PHF1-positive cells with cell type markers in the SGZ of the dentate gyrus. Hippocampal sections double-labeled with PHF-1 (red) and GFAP (A, Green), Ki-67 (B, green) or calbindin (C, green) show no colocalization. Scale bar = 50 μ m.

differentiation suggests that phosphorylated tau is present in immature neurons.

Phosphorylation of tau decreases the affinity of tau protein for microtubules [18]. This may explain the somatic staining found with the PHF-1 antibody. To test this, we performed immunofluorescence with 7.51, an antibody raised against the tubulin-binding domain of tau, and that therefore recognizes tau only when it is not bound to microtubules. Interestingly, the 7.51 antibody stained somas of DCX-positive cells, but not dentate gyrus granule cells. The distribution of 7.51 signal was very similar to that observed with PHF-1 antibody (Fig. 3). PHF-1 recognizes a phospho-epitope present C-terminal from the microtubule-binding domain (MBD). We next studied another two phosphorylation sites with phospho-specific antibodies which recognize serine 202 (AT-8 antibody, N-terminal from MBD) and serine 262 (12e8, in the MBD). With these antibodies a similar pattern was obtained, suggesting that tau protein in DCX-positive cells is hyperphosphorylated in different domains throughout the protein.

3.2. Neurogenesis in Tau-KO mice

To determine the role of tau protein in neurogenesis, we studied that process in Tau-KO mice. We first demonstrated that PHF-1 antibody gave no signal in hippocampal slices from Tau-KO mice (Fig. 4B). When Tau-KO and wild-type mice were compared, we observed that the number of DCX-positive cells was similar in both

mice (Fig. 4C). However, some DCX cells in wild-type mice could be found in the granular cell layer, whereas in Tau-KO mice the layer of DCX-positive cells was uniformly aligned with the SGZ. Quantification of DCX-positive migrating cells demonstrated that Tau-KO mice show a decrease in migration compared with wild-type animals (Fig. 4D).

4. Discussion

Adult-generated hippocampal neurons originate from precursor cells in the dentate gyrus, and as new granule cell neurons become integrated into the dentate gyrus. That process takes place throughout adult mammalian life. Adult neurogenesis at the dentate gyrus seems to be responsible for encoding new memories [19]. Here, we demonstrate that, at least in part, fetal phosphorylation (serines 396/404, 262 and 202) is related with adult neurogenesis in the SVZ and SGZ, although fetal-tau phosphorylation can be found in adult not only in these areas [14]. Thus, DCX-positive cells from SGZ and SVZ are colabeled with the antibody PHF-1, which recognizes tau phosphorylated in a fetal form. In addition, Tau-KO mice showed a significant decrease in the number of DCX-migrating cells compared with control.

In the hippocampus, the astrocytes from the SGZ (GFAP-positive) divide to generate intermediate precursors which are organized around the astrocytes. We here demonstrate that PHF-1 labeling is not found in GFAP- or Ki-67-positive cells, suggesting

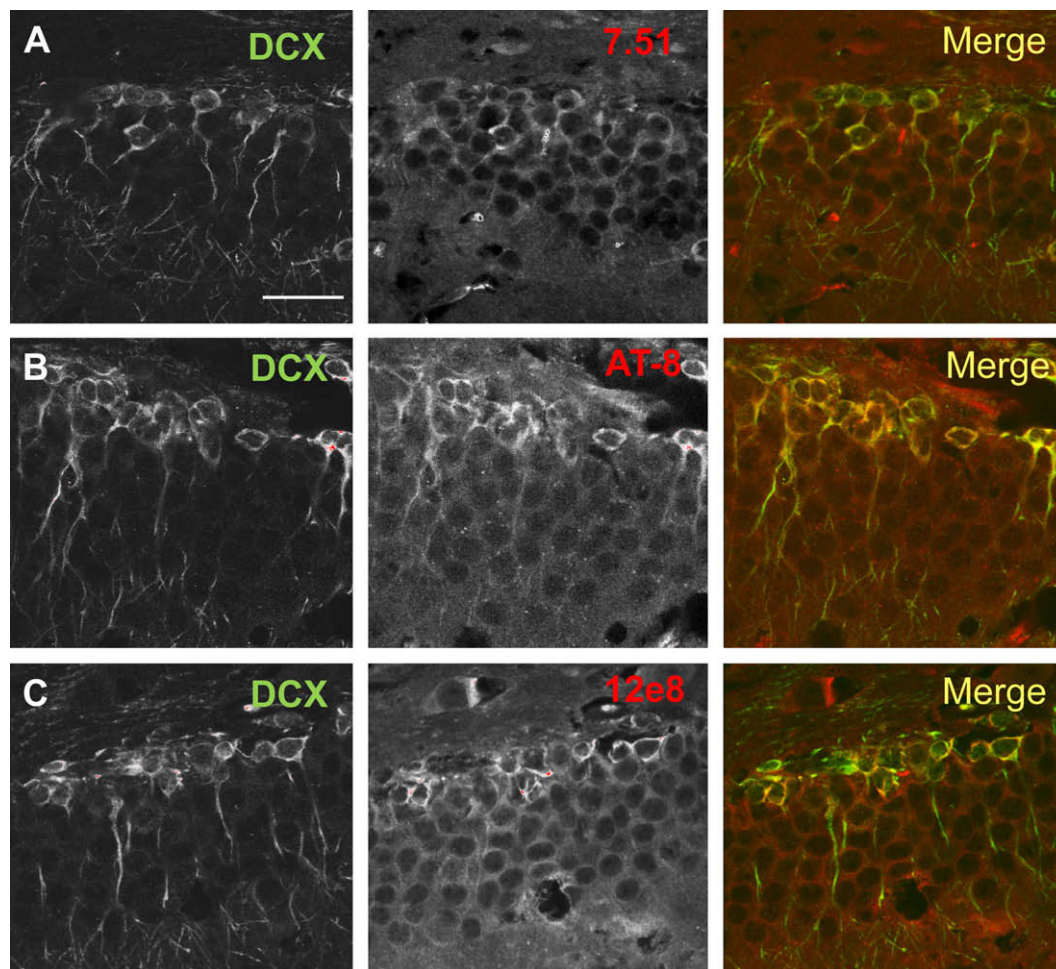


Fig. 3. Tau protein is not bound to microtubules and is phosphorylated on serine 202 and 262. (A) Representative colabeling of DCX-positive cells (green) with 7.51 antibody (red) in the SGZ of the dentate gyrus. (B) Hippocampal sections double-labeled with anti-DCX (green) and AT-8 (red) show colocalization of both. (C) The same result was obtained with 12e8 (red). Scale bar = 25 μ m.

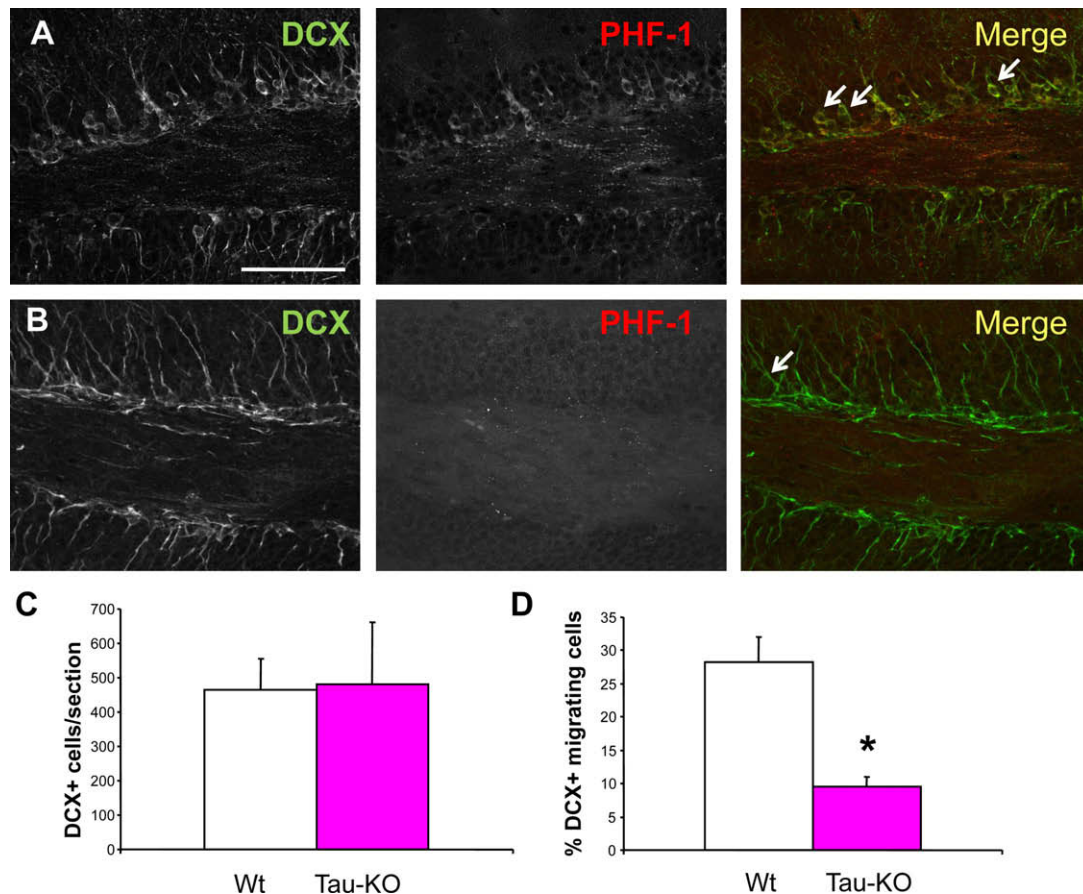


Fig. 4. Neurogenesis in Tau-KO mice. (A and B) Hippocampal wild-type sections double-labeled with anti-DCX (green) and PHF-1 (red) show colocalization of both in wild-type mice (A) but no PHF-1 signal could be observed in Tau-KO mice (B). (C) Quantification of the number of DCX-positive cells in wild-type (open bar) and Tau-KO (filled bar) mice. There is no significant differences between samples. However, when migration of DCX-positive cells was analyzed (D), a decrease in migration was observed in Tau-KO mice compared to wild-type mice. * $P < 0.001$. Arrows in (A and B) show migrating cells that have been quantified as described in Section 2. Scale bar = 50 μ m.

that phosphorylated tau in DCX-positive cells is present during neuritic outgrowth in SGZ, a pattern similar to that observed during development [13]. Also, we demonstrate that phosphorylated tau recognized by PHF-1 disappears in differentiated granular neurons (calbindin-positive). Our results also suggest that tau protein facilitates DCX-positive cells migration. This is supported by the observation of a decrease in migration of DCX-positive cells in Tau-KO mice. DCX-positive cells have to migrate from the SGZ to upper layers and send axons into the CA3 region. This process requires a dynamic microtubule network. Keeping this in mind, it is not strange to find phosphorylation of tau, as the phosphorylation decreases the affinity of tau protein for microtubules [18]. Interestingly, phosphorylated tau is accumulated in the somatic compartment, something that is also observed in developing neurons [13]. Altogether these results suggest that phosphorylation of tau during neurogenesis gives DCX-positive cells a less stable and more dynamic microtubule network. The need for a dynamic cytoskeleton is also supported by the observation that DCX-positive cells expresses tau isoform with three repeats, an isoform which shows lower affinity for microtubules compared to mature brain tau isoforms [11]. In mature brain, new tau isoforms are expressed, and the whole tau protein shows a higher microtubule-binding capacity than of that of fetal stages. Although this study has been mainly carried out in hippocampus, the same seems to occur in the SVZ, as we also demonstrate the presence of phosphorylated tau in DCX-positive cells from SVZ.

In conclusion, the observations summarized here favor the suggestion that tau provide a dynamic microtubule network which al-

low a proper migration of new generating neurons in adult neurogenesis. In addition, phosphorylated tau is a marker of neurogenesis in the SGZ and SVZ that colocalizes with DCX.

Acknowledgements

The authors thank Dr. J.J. Lucas for helpful discussion and comments. This work was supported by grants from the Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and the CIBER on Neurodegeneration and by institutional grants from the Fundación Ramón Areces.

References

- [1] Zhao, C., Teng, E.M., Summers Jr., R.G., Ming, G.L. and Gage, F.H. (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11.
- [2] Jones, S.P., Rahimi, O., O'Boyle, M.P., Diaz, D.L. and Claiborne, B.J. (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* 13, 413–427.
- [3] Andreadis, A., Brown, W.M. and Kosik, K.S. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626–10633.
- [4] Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.
- [5] Lovestone, S. and Reynolds, C.H. (1997) The phosphorylation of tau: A critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78, 309–324.
- [6] Goedert, M., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R.A. and Klug, A. (1996) Molecular dissection of the neurofibrillary lesions of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61, 565–573.

- [7] Goedert, M. and Spillantini, M.G. (2001) Tau gene mutations and neurodegeneration. *Biochem. Soc. Symp.*, 59–71.
- [8] Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J. and Crowther, R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393–399.
- [9] Lee, V.M., Goedert, M. and Trojanowski, J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.
- [10] Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M. and Hernandez, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384.
- [11] Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H. and Arendt, T. (2007) Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98–102.
- [12] Brion, J.P., Smith, C., Couck, A.M., Gallo, J.M. and Anderton, B.H. (1993) Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 61, 2071–2080.
- [13] Brion, J.P., Octave, J.N. and Couck, A.M. (1994) Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* 63, 895–909.
- [14] Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. and Gong, C.X. (2009) Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J. Neurochem.* 108, 1480–1494.
- [15] Grundke, I.I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. and Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913–4917.
- [16] Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I. and Vitek, M.P. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179–1187.
- [17] Novak, M., Jakes, R., Edwards, P.C., Milstein, C. and Wischik, C.M. (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 751. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5837–5841.
- [18] Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J. and Anderton, B.H. (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73, 1145–1157.
- [19] Aimone, J.B., Wiles, J. and Gage, F.H. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* 9, 723–727.

GSK3 β Overexpression Induces Neuronal Death and a Depletion of the Neurogenic Niches in the Dentate Gyrus

MaSalomé Sirerol-Piquer,^{1,2} Pilar Gomez-Ramos,³ Félix Hernández,⁴ Mar Perez,³ María A. Morán,³ Almudena Fuster-Matanzo,⁴ José J. Lucas,^{4,5} Jesús Avila,^{4,5*} and Jose Manuel García-Verdugo^{1,2,5*}

ABSTRACT: Overexpression of GSK3 β in transgenic mice induces learning deficits and some features associated with Alzheimer's disease (AD), including dentate gyrus (DG) atrophy. Here, we assessed whether these mice also recapitulate DG atrophy as well as impaired neurogenesis reported in AD. Ultrastructural analysis revealed that there were fewer and more disorganized neurogenic niches in these animals, coupled with an increase in the proportion of immature neurons. Indeed, the maturation of granule cells is delayed as witnessed by the alterations to the length and patterning of their dendritic trees and to the mossy fiber terminals. Together with an increase in neuronal death, these phenomena lead to a marked decrease in the number and disorganization of granule cells of the DG. Our results suggest that GSK3 β overexpression perturbs proliferation and maturation, resulting in the loss of immature neurons. In turn, the activation of microglia is stimulated in conjunction with a decrease in the birth of new functional neurons, leading to the deterioration of this structure. These data support the idea that by inducing degeneration of the DG, GSK3 β could be involved in the pathogenesis of AD. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: GSK3 β ; overexpression; hippocampal stem cells; proliferation; maturation; Alzheimer's disease

INTRODUCTION

In adult mammals, neurogenesis occurs principally in two brain regions: the subventricular zone and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus. In both these domains, the stem cells that exist are a subset of astrocytes (Doetsch and Hen, 2005). In the SGZ, astrocytes (Type B cells) divide to generate intermediate precursors (Type D cells), which remain in clusters of two to four cells in neurogenic niches that are formed by the processes of astrocytes (Seri et al., 2004). Type D cells progressively generate more differentiated progeny, which eventually mature into granule neurons. Ultrastructurally, astrocytes/Type B cells have a light cytoplasm that contains a few ribosomes and intermediate filaments, and their irregularly shaped contours intercalate between neighboring cells. Type D cells are found adjacent to Type B cells at the base of the granular cell layer (GCL), and they have smooth contours as well as a darker nuclei and dark scant cytoplasm containing many ribosomes. The newly differentiated granule cells that are produced grow dendrites into the molecular layer, and they send axons into the CA3 region. Although the precise physiological functions of neurogenesis as well as the full spectrum of functional implications in adult brain are still under intense investigation, it becomes apparent that new neurons that integrate in the hippocampus play important roles in aspects of learning and memory.

The magnitude of the neurogenesis declines with age, raising the possibility that reduced neurogenesis may account, to some degree, for the impaired learning and memory and cognitive deterioration in the elderly (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Tropepe et al., 1997; Kempermann et al., 1998, 2002). Adult neurogenesis in the dentate gyrus (DG) could be responsible for encoding new memories (Aimone et al., 2006). In humans, this DG neurogenesis has been related to learning and short-memory acquisition (Zhao et al., 2008).

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive memory loss and cognitive decline with DG degeneration, which could be due, in part, to impaired DG neurogenesis. There has therefore been an increasing level of interest in understanding

¹Departamento de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, 46980 Valencia, Spain; ²Departamento de Morfología Celular, Centro de Investigación Príncipe Felipe, CIBERNED, 46013 Valencia, Spain; ³Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain; ⁴Departamento de Neurociencia, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain; ⁵Centro de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación, Spanish Plan Nacional; Grant numbers: SAF2008-01274, SAF-2006-02424; Grant sponsor: CIBERNED; Grant number: CD06/05/113; Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III, Red de Terapia Celular (TERCEL); Grant number: RD06/0010/0022; Grant sponsor: Universidad Autónoma de Madrid; Grant number: CCG08-UAM-SAL-4207; Grant sponsors: Fundación Marcelino Botín, Fundación Ramón Areces, Comunidad Autónoma de Madrid.

*Correspondence to: Jesús Avila, Departamento de Neurociencia, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, C/Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain. E-mail: javila@cibm.uam.es or Jose Manuel García-Verdugo, Departamento de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, 46980 Valencia, Spain. E-mail: j.manuel.garcia@uv.es

Accepted for publication 16 March 2010

DOI 10.1002/hipo.20805

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

whether the process of neurogenesis is altered in the disease and thus contributes to cognitive impairment (Chuang; Jin et al., 2001; Jin et al., 2004; Li et al., 2008; Lazarov and Marr, 2009).

In familial AD (FAD), mutations in three genes encoding the APP, PS-1, and PS-2 proteins promote the onset of the disease (Price and Sisodia, 1998), which is associated with an increase in GSK3 β activity (Baki et al., 2004; Avila, 2006; Kimura et al., 2007; Townsend et al., 2007). In sporadic AD, GSK3 β overactivation may also occur, because a recently identified LRP6 genetic variation has been associated with late onset AD, resulting in a decrease in Wnt signaling and an increase in GSK3 β activity (De Ferrari et al., 2007). Also, GSK3 β has been associated with the risk of AD (Schaffer et al., 2008).

We have studied the effect of GSK3 β overexpression in DG neurogenesis in a conditional transgenic GSK3 β mouse (Lucas et al., 2001). We found that GSK3 β overexpression reduces proliferation and impairs maturation, making the neurogenesis in the DG unproductive, as these cells do not develop into fully mature, functional neurons. As a consequence, it appears that the decrease in the volume of DG is due to the depletion of neuronal progenitor cells and neurons.

MATERIALS AND METHODS

Animals, BrdU Injections, and Tissue Processing

Animal care

Tet/GSK3 β mice were generated as described previously (Lucas et al., 2001). Briefly, Tet/GSK3 β mice were bred by crossing TetO mice (carrying the bidirectional Tet-responsive promoter followed by the GSK3 β and β -galactosidase cDNAs, one in each direction) with CamKII α -tTA mice. The dual transgenic mice were designated Tet/GSK3 β , and they overexpress GSK3 β in the cortex and hippocampus. Transgenic mice as well as wt mice (C57BL/6) were bred at the *Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"* (Madrid, Spain), and the mice were kept on a normal light–dark cycle (12-h light–dark), with free access to food and water.

BrdU injections

Transgenic or wt mice (1 or 3 months old) received four consecutive intraperitoneal injections of BrdU (100 mg/kg) at a 2-h interval, and 2 h after the last injection, the animals were sacrificed by intracardial perfusion.

Tissue processing

Animals were anesthetized and perfused intracardially with 0.9% saline followed 4% paraformaldehyde (PFA). The brain was removed, postfixed overnight in 4% PFA, and 40- μ m coronal or 30- μ m sagittal sections were obtained on a vibratome.

For electron microscopy (EM), animals were perfused with 0.9% saline followed by 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde.

Hippocampus

Their brains were removed and postfixed overnight in the same fixative, and 200- μ m coronal sections were obtained and processed for EM (see below). All animal care was carried out in accordance with institutional guidelines.

Immunohistochemistry

For BrdU immunostaining, sections were incubated in 2 N HCl (30 min at 37°C) and then rinsed for 15 min in 0.1 M borate buffer (pH 8.5). For BrdU, doublecortin, Iba1, and MAP2 immunohistochemistry, the sections were rinsed in PBS and incubated in blocking solution, followed by an overnight incubation at 4°C with the primary antibody: mouse anti-BrdU, 1:150 (DakoCytomation); mouse anti-DCX 1:400 (Santa Cruz Biotechnology); rabbit anti-Iba-1 1:200 (Wako); or rabbit anti-MAP2, 1:250 (Sigma). The sections were then washed and incubated for 1 h with a goat antimouse biotinylated antibody (1:400, Vector) and then for 90 min with an avidin–biotin–peroxidase complex (ABC, 1:250, Vector). The antibody staining was finally visualized with diaminobenzidine (DAB, 0.05%, Sigma), and the sections were counterstained with cresyl violet.

For immunofluorescence, immunostaining was carried out following a standard procedure. The sections were first blocked for 1 h and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: mouse anti- β -gal, 1:200 (Promega); mouse anti-GFAP, 1:400 (PharMingen); rabbit anti-DCX, 1:150 (Abcam); chicken anti-TUJ1, 1:500 (Chemicon); mouse anti-Nestin, 1:150 (Sigma); mouse anti-PSA-NCAM, 1:200 (AbCys). After washing with PBS, the primary antibodies were detected with the appropriate mouse, rabbit, or chicken Alexa-Fluor-488/647 secondary antibody (Invitrogen), and the sections were examined by confocal laser microscopy.

Cell Counting

The quantification of the cells that took up BrdU was performed in five mice in each group of 1 and 3-month-old mice. Two series of systematically selected brain sections (200 μ m, every sixth section, and five to six sections in each series) were studied in each animal. Only BrdU⁺ cells located in the SGZ were counted using a 100 \times oil immersion lens. The Student's *t*-test for pairwise comparison was used for the statistical analysis, and value of $P < 0.001$ was considered significant for 1-month-old mice and $P < 0.005$ for 3-month-old mice. The BrdU⁺ cell counts were plotted as percentages. To validate the quantification data, a CAST stereological system was applied to the same series of sections as those counted previously in two animals from each group.

The number of BrdU⁺ cells in the foci was counted in the SGZ. The foci were classified by categories according to the number of BrdU⁺ cells present, and they were considered as category 1 or 2 when they contained one or two BrdU⁺ cells, respectively. A chi-square nonparametric statistical analysis ($P < 0.005$) and correlation analysis were carried out.

Timm Staining

The tissue was processed for Timm staining as described previously (Wenzel et al., 1997), whereby the sections were placed in a desiccation chamber with a beaker with 100 ml of a 0.1% Na₂S (pH 7.3). After 24 h, the sections were rinsed in 95% EtOH, followed by 70% and 50% EtOH, and finally water. Subsequently, the sections were placed in the developer solution for 3 h and then rinsed in running tap water for 10 min, and finally they were placed in a 5% sodium thiosulphate solution and rinsed with water.

Tissue Processing for Semithin Sections and EM

Coronal sections (200 μ m), corresponding to the same hippocampal region, were postfixed in 2% osmium tetroxide (OsO₄) for 2 h, rinsed, dehydrated, and embedded in Durcupan (Durcupan, Fluka). To study the overall organization of the DG, the number of niches, and microglia, serial semithin sections (1.5 μ m) were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue. Subsequently, the area of interest was trimmed, and ultrathin sections (0.06 μ m) were obtained from this material with a diamond knife, which was stained with lead citrate and examined under a Fei Tecnai Spirit electron microscope.

Microglia and niches quantification were carried out on 15 serial semithin sections per mouse and on three mice per group. The same slides were used to quantify both microglia and niches. Data are reported as the means (\pm SD) of the number of microglia or niches per millimeter square in the DG. The Student's *t*-test was used for pairwise comparison, and *P* < 0.005 was considered significant. In some experiments, the optical dissector was used for the analysis, and similar results were obtained.

RESULTS

DG Neurodegeneration with the Aging of Tet/GSK3 β Mice

Overexpression of GSK3 β in vivo produces neuronal cell death as well as increasing the number of reactive microglia in the DG of 3-month-old mice (Lucas et al., 2001). To characterize this neurodegeneration, we analyzed thionine staining in brain sections from 2-year-old Tet/GSK3 β mice. The images showed a clear reduction in the size of the DG, which is almost completely lost in Tet/GSK3 β mice when compared with the wt mice (Figs. 1A,B). At 3 months of age, a smaller reduction in thickness was observed in the GCL in Tet/GSK3 β mice (Figs. 1C,D) and, thus, there appears to be a progressive shrinking of the DG with age (Fig. 1). Similar differences were found when the Tet/GSK3 β mice were compared to Tet O/GSK3 β mice rather than the wt mice (see Lucas et al., 2001 and Supporting Information Fig. 1).

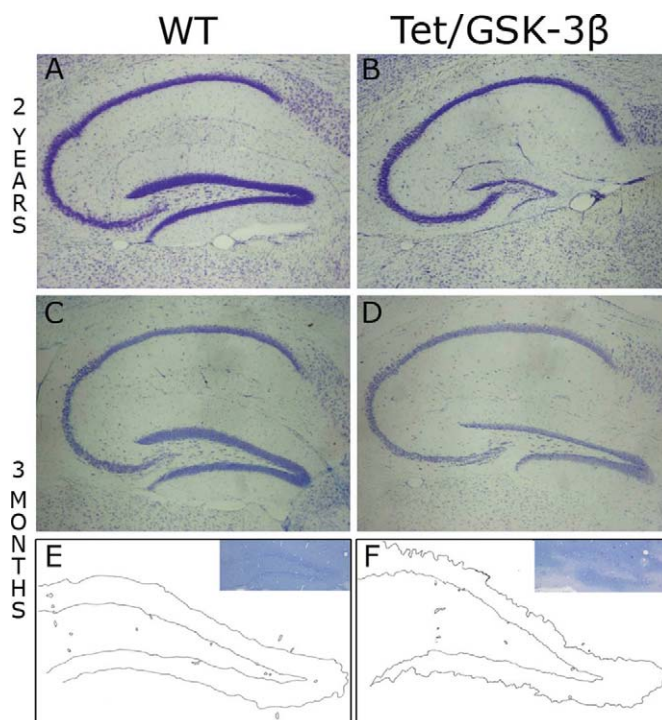


FIGURE 1. DG atrophy in Tet/GSK3 β mice. Thionine-stained sagittal sections from 2-year-old wt (A) and Tet/GSK3 β (B) mice as well as sections from 3-month-old wt (C) and Tet/GSK3 β (D) mice. DG brightfield microscopy camera lucida images from 3-month-old wt (E) and Tet/GSK3 β (F) mice. The pictures corresponding to the drawn sections are depicted in the upper part of the image. Pictures were obtained from the same level. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

To study the morphological changes to the DG in further detail, 1.5- μ m toluidine-stained sections from 3-month-old Tet/GSK3 β and wt mice were analyzed by brightfield microscopy. The camera lucida images obtained showed a clear reduction in thickness of the GCL, as well as discontinuities, not only in the SGZ where the neurogenic niches are located but more clearly in the supragranular zone that is composed of differentiated granule neurons (Figs. 1E,H). These results suggest that the new cells generated were poorly organized and that the activity of the niche had been dampened. Furthermore, these changes were accompanied by the presence of abundant microglia (see below).

DG Disorganization and Impoverished Survival of the Neurogenic Niches in Tet/GSK3 β Mice

The degeneration in the DG could be the result of increased neuron death and/or diminished neurogenesis. To further analyze the progressive atrophy of the DG, we studied the organization of the GCL in toluidine-blue semithin sections. Although the characteristic columnar organization of the GCL was evident in a panoramic view of the wt DG (Fig. 2A), the DG of Tet/GSK3 β mice was more randomly arranged (Fig. 2B). Moreover, instead of presenting the homogeneous profile observed at the wt sections, the supragranular zone was

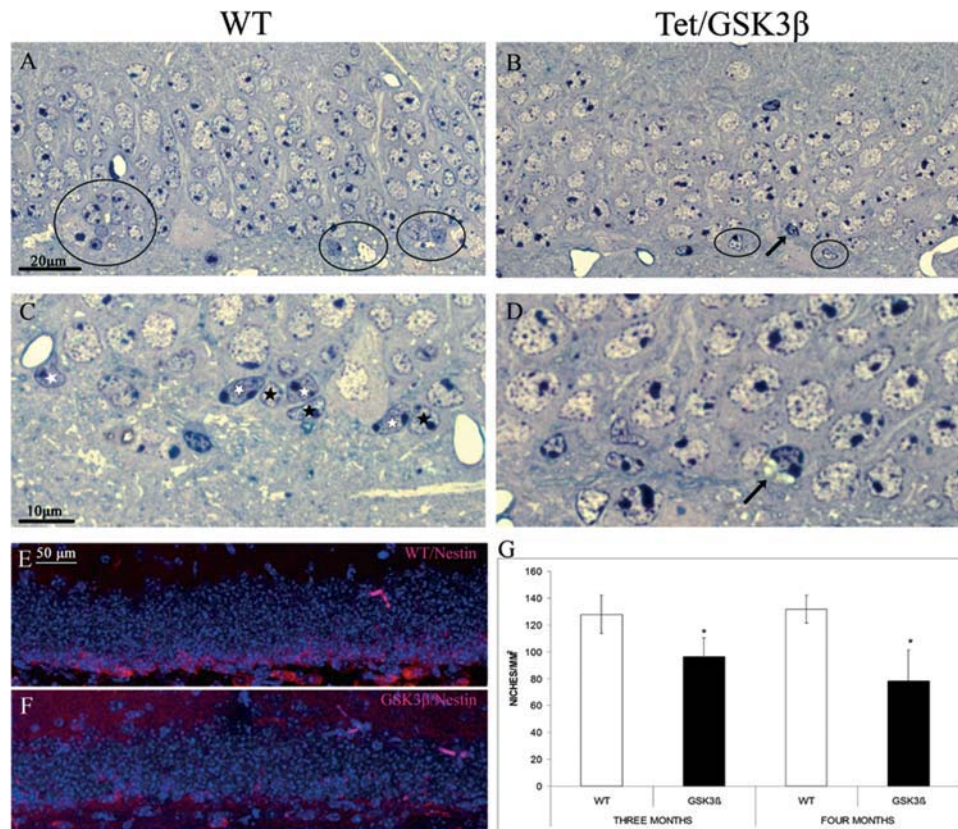


FIGURE 2. Cellular disorganization and impaired development of neurogenic niches in the DG of Tet/GSK3 β mice. **A, B:** Semithin sections stained with toluidine blue showing a panoramic view of the DG. In wt (**A**), the typical columnar organization is observed, whereas in Tet/GSK3 β mice (**B**), a more mosaic organization of the cells is evident. Microglia are indicated by arrows and the niches containing type B and/or type D cells are enclosed by circles. **C, D:** Detail of the niches in the SGZ, with astrocytes/stem cells (black

asterisks) and type D cells (white asterisks). Note the difference in the number of cells and the composition of the neurogenic niches. Microglia (arrows) are located close to the niche in Tet/GSK3 β mice. Nestin immunostaining in wt (**E**) and Tet/GSK3 β mice (**F**). There is a reduction in the number of Nestin⁺ cells in Tet/GSK3 β mice. Quantification of the neurogenic niches in serial semithin sections (**G**).

more irregular and its thickness diminished (Figs. 2A,B). As described previously, the soma of astrocytes or type B (GFAP⁺) cells lies in the SGZ, and these cells extend a single or dual apical process radially across the GCL (Encinas et al., 2006). However, this organization was not evident in Tet/GSK3 β mice, and astrogliosis was observed ((Lucas et al., 2001) and Supporting Information Fig. 1). We found that astrocytes were displaced laterally, occupying the empty spaces that appeared after neurodegeneration (Supporting Information Fig. 2). These results suggest that proliferation, migration, and/or differentiation of precursor cells might be affected in Tet/GSK3 β mice.

To study how proliferation was affected, the neurogenic niches in the DG were analyzed. In wt sections, the neurogenic niches could be clearly discerned due to their morphology, the number of cells, and their composition. By contrast, in the Tet/GSK3 β sections, there was an important reduction in the number of niches, and their composition was also affected. Thus, in wt animals, the neurogenic niches were rich in each cell type (1–2 astrocytes/Type B cells and 2–4 Type D cells), whereas, in the Tet/GSK3 β niches, there was a reduction in the Type B cells and in particular of the Type D cells (Figs. 2C,D).

The changes in the neurogenic niche were quantified in toluidine-blue semithin sections from 3 and 4-month-old mice. The results showed a 1.3-fold reduction in the density of the neurogenic niches in GSK3 β mice when compared with wt mice, which progressed to a 1.7-fold reduction after 4 months (Fig. 2G). These data indicate that the neurogenic niches diminish in size and number over time. These data were confirmed by examining the immunostaining for Nestin, which demonstrated the loss of neural progenitor cells in the transgenic mice: astrocytes (type B or stem cells) and more immature but still proliferating type D cells (Figs. 2E,F).

Cell Proliferation in the SGZ

To further study cell proliferation in the SGZ, BrdU incorporation into dividing cells was assessed after its intraperitoneal injection into 1 and 3-month-old wt and Tet/GSK3 β mice. There was less BrdU incorporation in 40- μ m sections from Tet/GSK3 β mice than from wt mice (Fig. 3A). Indeed, when quantified, there was a significant decrease in the number of BrdU⁺ cells in 1 and 3-month-

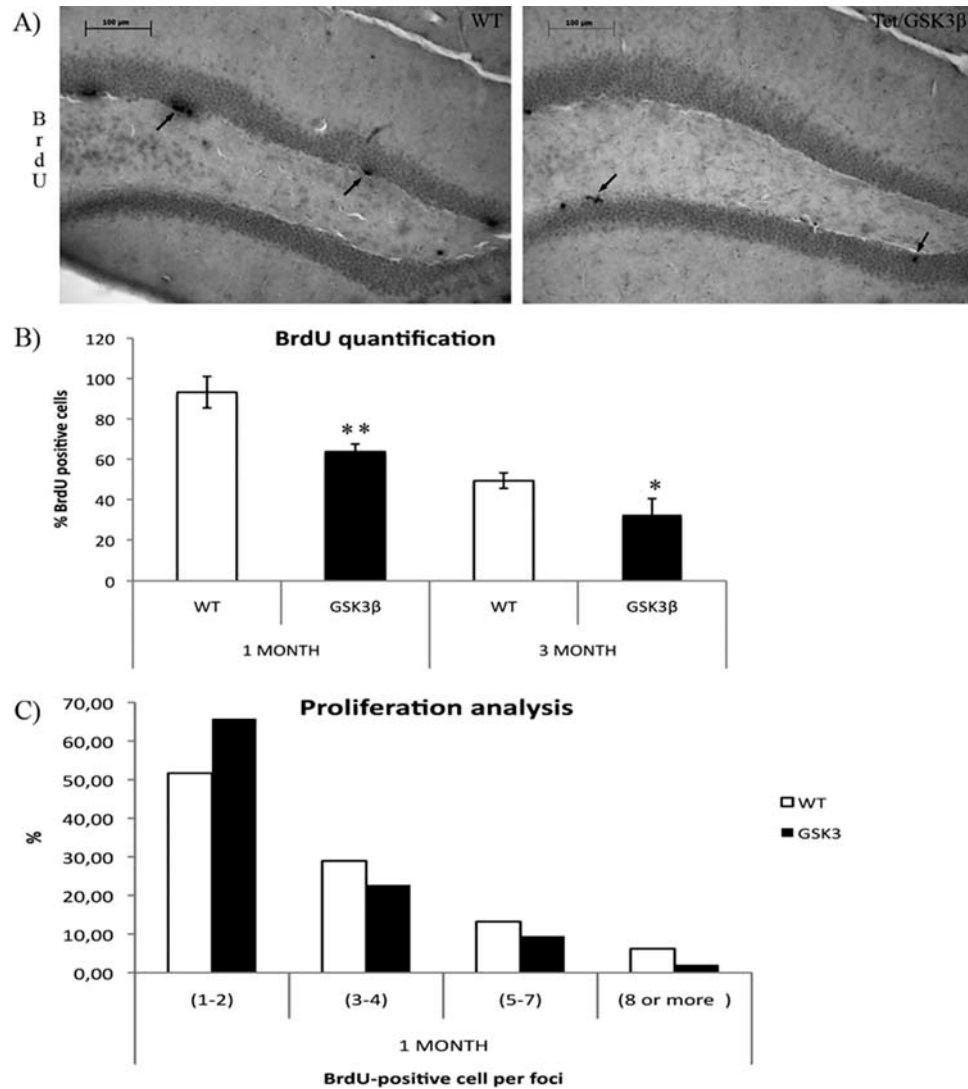


FIGURE 3. Proliferative characteristics in the SGZ of the DG. BrdU immunostaining in wt and Tet/GSK3 β mice. BrdU⁺ cells are indicated by arrows (A). Proportions of BrdU⁺ cells in 1 and 3-month-old wt and Tet/GSK3 β mice ($n = 5$ per group) ** $P < 0.001$ and * $P < 0.005$ (B). Quantification of the foci (proliferative neurogenic niches) based on the number of BrdU⁺ cells as an

approximation of their proliferative capacity (C). Category 1–2 means one or two BrdU⁺ cells in the foci, and so on. A chi-square test (including the Pearson chi-squared value and the linear-by-linear correlation factor) showed that the differences between wt and Tet/GSK3 β mice are statistically significant.

old Tet/GSK3 β mice when compared with wt mice (Fig. 3B), in accordance with the reduction in the number of neurogenic niches. A more precise cell quantification through a stereological analysis with an optical disector method confirmed that there were fewer BrdU⁺ cells in GSK3 β mice, indicating that wt mice had 1.4-fold and 1.6-fold more cells that incorporated BrdU at 1 and 3 months of age, respectively (Supporting Information Fig. 3).

Taking into account the quantitative and immunohistochemical data, as well as the morphological observations, the reduction in cell proliferation appears to be due to a loss of neural progenitor cells. Indeed, the pattern BrdU staining supports this hypothesis, because many of the multiple foci of proliferating cells in wt mice contain several BrdU⁺ cells (neural progen-

itors such as astrocytes and more immature type D cells), whereas, in Tet/GSK3 β mice, there was a reduction not only in the number of foci, but also in the number of labeled cells in each niche. To confirm these observations, the number of BrdU labeled cells per foci were quantified (Fig. 3C) in 1-month-old mice that have more niches. The neuroprecursor cells behaved distinctly in Tet/GSK3 β and wt mice. While wt mice tended to present niches containing more than three BrdU⁺ cells, Tet/GSK3 β mice tended to present less BrdU⁺ cells per niche. So there is a tendency to present more neuroprecursor cells per niche in wt mice, which correlates with the tendency of Tet/GSK3 β mice to present less neuroprecursor cells per niche as indicated by the linear-by-linear correlation factor $p < 0.005$ (Fig. 3C).

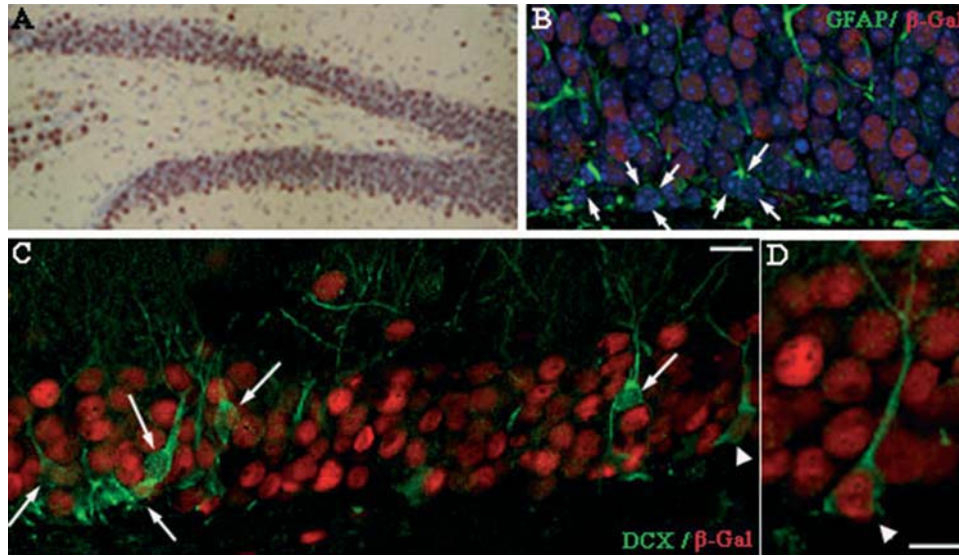


FIGURE 4. β -Galactosidase expressing cells in the DG. **A:** β -Galactosidase immunohistochemistry in 3-month-old Tet/GSK3 β mice showing the abundance of β -galactosidase expressing cells along the GCL. **B:** Double-immunolabeling for GFAP (green) and β -galactosidase (red). Detail of the SGZ, where the staining seems less evident than in other areas. Most, if not all, GFAP $^{+}$ cells do not express β -galactosidase and, thus, astrocytes probably do not

overexpress GSK3 β . White arrows indicate astrocytes. **C, D:** Hippocampal sections double-labeled with antidualcortin (green) and anti- β -gal (red). **C:** Panoramic view of the DG showing that most cells are only DCX $^{+}$ (white arrows) and only one of them is double labeled (arrowhead; scale bar = 30 μ m). **D:** Magnification of a double-labeled cell (Scale bar = 20 μ m).

Neuronal Maturation at DG in Tet/GSK3 β Mice

The disorganization of the GCL could reflect the failure of the newborn cells to mature and migrate. Interestingly, many cells present in different layers of the DG expressed β -gal, a marker of the GSK3 β transgene (Figs. 4A,B). To study which cell types overexpressed β -gal, the colocalization of GFAP (a marker of astrocytes) or doublecortin (DCX, a marker of immature neurons) with β -gal was assessed. Although astrocytes did not overexpress GSK3 β (Fig. 4B), the proliferation data suggested that neural progenitor cells derived from astrocytes should express GSK3 β . However, most of the cells expressing DCX were β -gal negative, although a few of them were labeled for both markers (Figs. 4C,D). These results indicated that not only mature granular neurons but also, newborn cells at different stages of maturation overexpress GSK3 β .

The length and pattern of the dendritic arborization is thought to be correlated with the degree of granule cell maturation (Seri et al., 2004; Zhao et al., 2006). In wt mice, the majority of the DCX $^{+}$ cells were uniformly oriented, aligned with the SGZ to form a layer one or two cell thick. Moreover, their apical dendrites bifurcated within the outer half of the GCL, further branching within the inner portion of the molecular layer. By contrast, in GSK3 β transgenic mice, the DCX $^{+}$ cell layer was thicker (more than two cells thick), and immature neurons were frequently observed outside the SGZ immersed in the GCL. These immature neurons were morphologically more heterogeneous due to the altered orientation of their dendrites (Fig. 5B). We commonly observed granule cells with irregularly oriented apical dendrites and modified dendritic

branching, as well as cells with shorter primary dendrites that bifurcated in close proximity to the neuronal soma and that formed dendritic trees with a “bushy” appearance within the GCL. Furthermore, the presence of type D cells in the GCL was confirmed in toluidine blue stained semithin sections and by EM. These results suggest that the maturation of newborn cells was blocked in the transgenic mice (Fig. 5B). This staining was more evident in three rather than the 1-month-old transgenic mice (Figs. 5A,B).

These optical observations were validated by quantifying the DCX $^{+}$ cells in 1 and 3-month-old mice (Fig. 5C), and although no differences were observed in the younger mice, in 3-month-old mice the number of DCX $^{+}$ cells was greater in Tet/GSK3 β mice. To quantify the failure in maturation, the length from the soma to the bifurcation in the primary dendrite was measured (Fig. 5D). As expected, this parameter was shorter in Tet/GSK3 β than in wt mice, supporting the visual impression that the dendrites bifurcated closer to the soma in the Tet/GSK3 β mice. To confirm these data, immunostaining was performed with antibodies against PSA-NCAM and TUJ1, other markers of immature neurons (Supporting Information Fig. 4). PSA-NCAM and TUJ1 staining clearly increased in the Tet/GSK3 β mice when compared with wt mice, suggesting a block in maturation.

We analyzed maturation in wt (Figs. 6A–C) and Tet/GSK3 β (Figs. 6B–D) mice and, as expected, 1-month-old wt mice maintained more neurogenic niches in the SGL (subgranular layer) than 3-month-old wt mice (Fig. 6A). Mature granule neurons were clearly identified by EM, and they displayed a

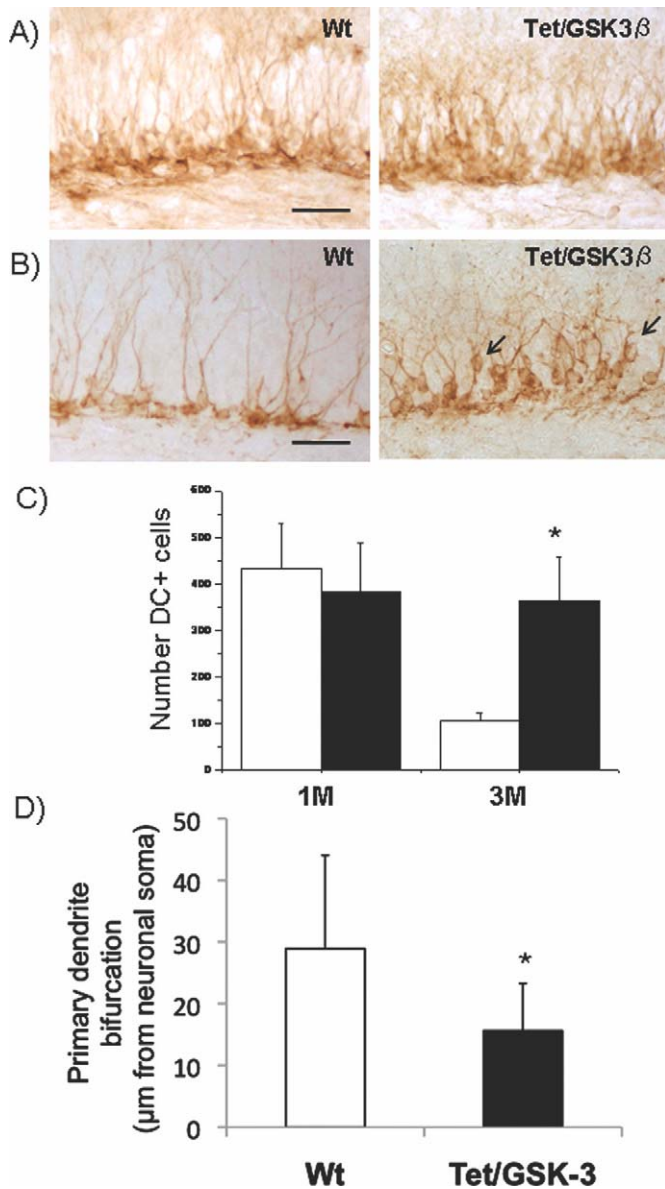


FIGURE 5. Maturation and proliferative characteristics in the SGZ of the DG. Doublecortin immunostaining of the DG from 1 (A) to 3-month-old (B) wt and Tet/GSK3 β mice. Note the elevated number and the atypical situation of the DCX⁺ cells in the GCL (arrows; scale bar = 100 μ m). C: There are more immature neurons in 3-month-old Tet/GSK3 β mice (* P < 0.02). D: Dendritic analysis. Confocal sections of individual Dcx⁺ cells (wt = 61 and Tet/GSK-3 β = 83) were reconstructed from confocal z stacks. The first ramified point in close proximity to the neuronal soma of the dendritic arbor was quantified using ImageJ software with the NeuronJ plugin (* P < 0.0001). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

characteristic organization with abundant cytoplasmic organelles and clumped chromatin (Fig. 6C). By contrast, there were more immature cells in 1-month-old Tet/GSK3 β mice than in 3-month-old Tet/GSK3 β mice, and even more than 1-month-old wt mice (Fig. 6B). In addition, fully mature granular neurons were not observed in the GCL of the Tet/GSK3 β mice, and most granular cells had a generally immature aspect,

mainly characterized by their lax chromatin (Fig. 6D). These results again indicated that there was a block in the maturation process.

Mossy Fiber Terminals

The dendrites of newly differentiated granule cells grow into the GCL, and these cells send axons into the CA3 region. Structurally, the endings of these axons form the characteristic mossy fiber terminals (MFT) that contain numerous peripherally located mitochondria, usually associated in groups. Giant spines or excrescences from the CA3 protrude into the MFT, and they establish multiple asymmetric synaptic contacts (Amaral and Dent, 1981). Postnatal development of the mossy fiber continues for ~1 month after birth, after which these mossy fibers are on the whole fully matured. Accordingly, we further analyzed the block in maturation by studying the mossy fiber boutons of the *stratum lucidum* of the CA3 in 1-month-old wt and Tet/GSK3 β mice by EM.

Mature mossy fibers appeared as large complex expansions in 1-month-old wt mice, indented by several dendritic spines that formed multiple synapses, and they were characterized by the presence of small clear vesicle clusters confined to restricted areas of the boutons (Fig. 6E). In Tet/GSK3 β mice, the terminals were sparsely packed and rounded, with smooth contours. Only a few spines protruded into the MFTs that were completely filled with vesicles rather than presenting clusters of vesicles close to the synaptic active zones (Fig. 6F).

Timm staining selectively labels the synaptic terminals of mossy fibers due to their high-Zn²⁺ content, providing a tool to examine the development of mossy fibers (Danscher et al., 1976; Amaral and Dent, 1981). The pattern of Timm staining differed in 1-month-old wt and Tet/GSK3 β mice, because there was a decrease in both the area stained and the intensity in Tet/GSK3 β mice (Supporting Information Fig. 5). Moreover, Timm staining totally disappeared in older mice (Engel et al., 2008), suggesting that mossy fibers failed to mature.

Neuronal Migration in DG of Tet/GSK3 β Mice

The maturation of newborn cells requires dendrite and axon morphogenesis and migration toward the GCL. These are highly dynamic processes that involve the microtubular cytoskeleton. Overexpression of the GSK3 β protein is known to affect the microtubular organization, which, in turn, could affect the maturation, organization, and composition of the neurogenic niches as well as the reported alterations to the mossy fibers.

Microtubule organization was analyzed in 1 and 3-month-old mice, and parallel microtubule arrays were observed in the apical dendrites of granular neurons in wt mice (Figs. 7A–C). By contrast, microtubules were highly distorted and disorganized in the dendrites of Tet/GSK3 β mice (Figs. 7B–D), which may reflect the modifications to microtubule proteins. Indeed, it was previously shown that the tau protein is hyperphosphorylated in Tet/GSK3 mice (Lucas et al., 2001). We also analyzed a microtubule protein mainly present in dendrites,

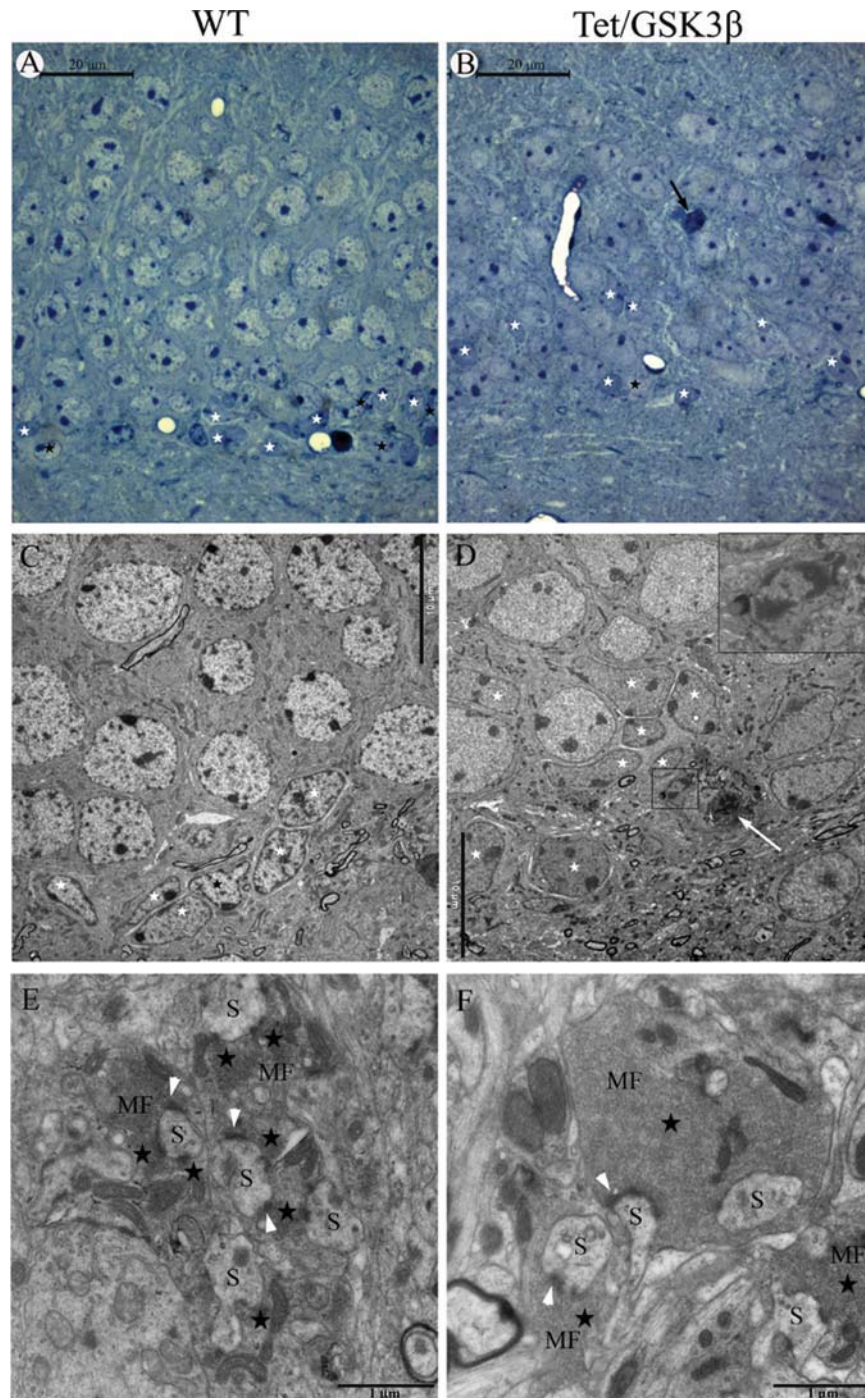


FIGURE 6. Impaired maturation in 1-month-old Tet/GSK3 β mice. A, B: Semithin sections of the DG from 1-month-old wt and Tet/GSK3 β stained with toluidine blue. The chromatin organization is altered in Tet/GSK3 β mice, and there are differences in the organization and cell composition of the niches in the SGZ. In wt mice, the neurogenic niches form a homogeneous layer in the SGZ, whereas in Tet/GSK3 β mice, the cells are dispersed in the GCL. Type D cells (white asterisks) are more abundant, and they are not only located in the SGZ but also in the GCL of Tet/GSK3 β mice. Type B cells are labeled with black asterisks, and the microglia are indicated by black arrows. C, D: Electron micrographs of niches in the SGZ. In addition to the differences in chromatin organization in wt samples (smooth chromatin characteristic of immature cells and clumped chromatin characteristic of mature cells), Type B and Type D cells are readily recognized in the SGZ. By contrast, the differences between these cells are not

so marked in Tet/GSK3 β mice, which make it difficult to distinguish them. This is due to the lack of differentiation (the differentiation in 1-month-old Tet/GSK3 β mice resembles that observed in P6 wt mice). In Tet/GSK3 β mice, pyknotic cells (white arrows) and microglia (enlarged image) are frequently observed. E: Electron micrograph of 1-month-old wt mossy fiber expansion synapse (MF) that contacts a pyramidal cell dendrite and that interacts with several dendritic spines (S) from CA3 proximal apical dendrites, emphasizing the relatively mature appearance of this complex at this stage. The terminals form numerous synaptic contacts (white arrowheads) with dendritic spines and clusters of vesicles (black asterisks) are located close to the contacts. By contrast, MFs have a smoother contour, and they interact with fewer dendritic spines in Tet/GSK3 β (F) mice. The vesicles are uniformly distributed along the cytoplasm.

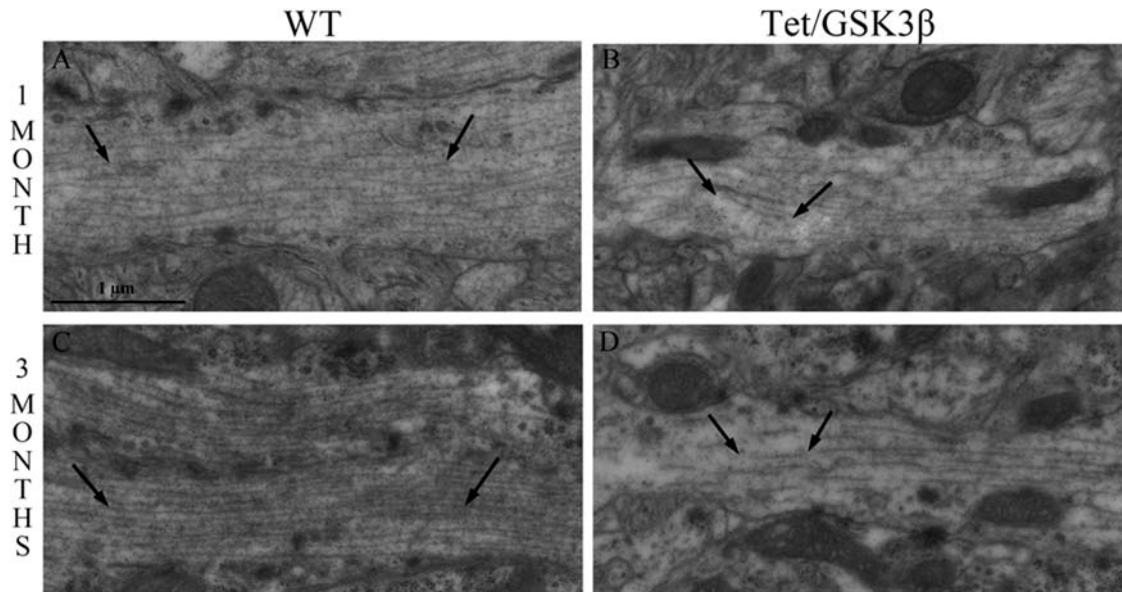


FIGURE 7. Microtubule disorganization. Electron micrographs of microtubules in the dendrites of granular neurons. In 1 (A) and 3-month-old (C) wt mice, microtubules are arranged longitudinally and parallel to one another, whereas in 1 (B) and 3-month-old (D) Tet/GSK3 β mice, the microtubules appear to be disorganized.

MAP2, a heat-stable phosphoprotein predominantly expressed in the cell body and dendrites of neurons (Shafit-Zagardo and Kalcheva, 1998; Sanchez et al., 2000a) that is also a substrate for GSK3 β (Sanchez et al., 2000b). Interestingly, there was a weaker MAP2 dendritic staining in Tet/GSK3 β mice than in wt mice (Supporting Information Fig. 6).

Microglia Activation

Failed maturation and migration could induce neuronal death and degeneration, which would eventually activate microglia. Iba1 immunostaining showed an increase not only in the number of microglia but also in the size somata due to their activation in Tet/GSK3 β mice compared to wt mice, confirming earlier observations (Fig. 8A). To study these changes in microglia, semithin toluidine-stained sections and EM ultrathin sections from 3 and 4-month-old mice were analyzed. In the semithin sections, microglia was characterized by their dark nucleus and the vacuoles (lysosomes) in their cytoplasm (Ibrahim et al., 1974). A increase not only in the somata size of the cell but also in the number of microglia was observed in Tet/GSK3 β mice. Interestingly, this abundant microglia was mainly located close to the niches in the SGZ and near degenerated neurons in the GCL. Hence, newborn cells appear to suffer a problem in maturation and/or migration, and they subsequently degenerate and are phagocytosed. Moreover, we found that Tet/GSK3 β microglia were more reactive than those in wt mice, given the number of lysosomes and heterogeneous bodies observed in their cytoplasm (Fig. 8B).

Microglia was quantified in semithin sections to assay the differences between Tet/GSK3 β and wt mice. In 3-month-old

Tet/GSK3 β mice, there was a 1.96-fold higher density of microglia than in wt mice (Fig. 8C). At 4 months, the increase in the density of microglia in Tet/GSK3 β mice was 3.12-fold higher than in wt mice (Fig. 8C), suggesting an increase in reactive microglia over time. Interestingly, this increase in the microglia was correlated with the reduction in neurogenic niches (Fig. 8D). These results were in agreement with previous studies in which neuronal death was confirmed by TUNEL/cleaved caspase-3 staining, and the presence of reactive glia and astrogliosis was reported (Lucas et al., 2001).

DISCUSSION

We have raised a conditional transgenic mouse that overexpresses GSK3 β in the forebrain, and we have characterized some of the pathological effects of this altered expression (Lucas et al., 2001). These GSK3 β transgenic mice have a smaller DG (Engel et al., 2006), which could be due to a failure in cell proliferation and maturation/migration that eventually produces premature neuron death. Also, they show an impaired memory (Hernandez et al., 2002).

Our results indicate that GSK3 β overexpression provokes a block in cell maturation, which may be due to distinct effects. On one hand, immature neurons at different stages of maturation with excess GSK3 β activity may experience modifications of some substrates of this kinase, like tau or MAP2 (Sanchez et al., 2000a; Lucas et al., 2001; de Barreda et al., 2010),

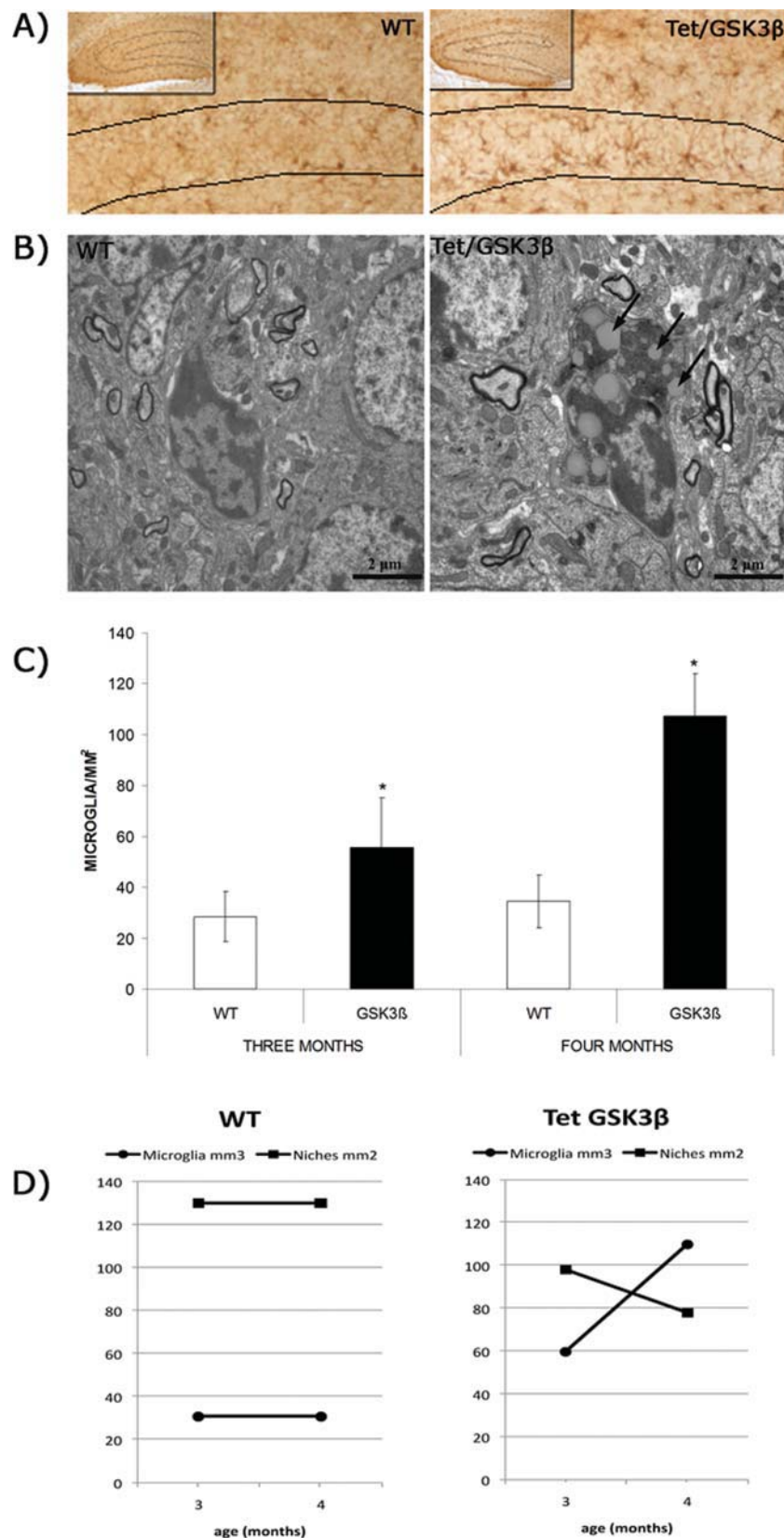


FIGURE 8. Increase Iba-1 immunostained and reactive microglia. **A:** DG immunostaining for microglia (Iba-1) in 3-month-old wt and GSK3 β mice. **B:** Electron micrographs of microglia in wt and Tet/GSK3 β mice. In GSK3 β mice, microglia appear to be more reactive due to the abundance of lysosomes and expansions.

C: Quantification of Iba1 labeling in semithin sections of 3 and 4-month-old mice indicating an increase in microglia over time. **D:** Correlation between the decrease in neurogenic niches and the increase in microglia.

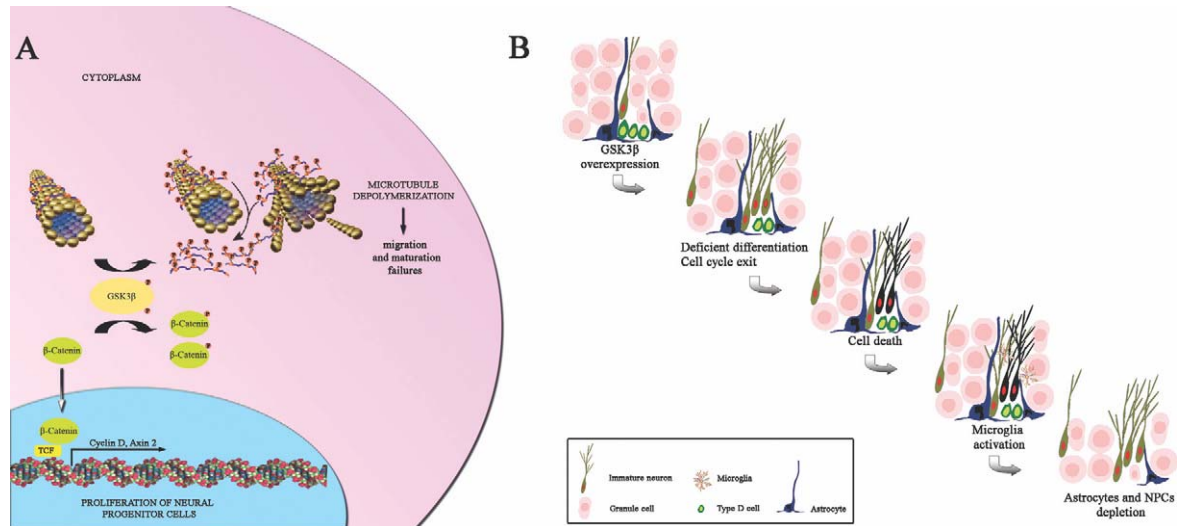


FIGURE 9. A working model of the neurogenic changes due to GSK3 β overexpression. **A:** Scheme of the proposed role of GSK3 β in the SGZ. This scheme presents a molecular mechanism by which the activation of GSK3 β on one hand could produce premature exit from the cell cycle and the differentiation of neural precursor cells (NPCs), and on the other hand, a block in maturation. **B:** GSK3 β may be overexpressed in AD in a similar way as in our transgenic model. Hence, NPCs could overexpress GSK3 β (or GSK3 β could be activated), provoking exit from cell cycle, reducing the NPC population and inducing premature differentiation.

These cells and the cells at different stages of maturation will over-express GSK3 β , producing defects in maturation and migration. All these phenomena lead to premature neuronal death in some cases, which will activate microglia. Astrocytes continue to divide to replenish the NPC population and generate fully mature granular neurons. The newly generated cells will suffer from the aforementioned problems and the cycle will start again. This repeated cycle could result in the long-term depletion of astrocytes and NPCs and the ensuing decrease in DG size. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

impairing their morphological differentiation and migration. The failure in migration could be due to microtubule disorganization and the interference in maturation. The failure in maturation is patent in 1-month-old GSK3 β mice in which no fully mature neurons are observed by EM, as well as in 3-month-old GSK3 β mice where the mossy fibers and synaptic boutons do not develop properly. On the other hand, neuronal progenitor cells may prematurely exit the cell cycle, prompting premature cell differentiation. This would lead to an accumulation of immature cells, whereas astrocytes/Type B cells still divide to produce new neuronal progenitors. In this scenario, the astrocyte population may be exhausted due to the continuous proliferation undertaken to replenish neural stem progenitor cell populations, which would explain the reduction in the number of astrocytes and neurogenic niches.

Why neural precursor cells (NPCs) prematurely exit the cell cycle is still not clear. It is possible that more undifferentiated type D cells start overexpressing GSK3 β and promote cell-cycle exit through β -catenin signaling. However, we have no evidence that those proliferating cells, which should be mainly present in the SGZ, express GSK3 β in our transgenic model. Alternatively, defects in maturation and neurodegeneration could activate GSK3 β in NPCs, or GSK3 β may be indirectly involved in cell proliferation.

FAD is a memory disorder that is provoked by mutations in three genes. One of these encodes the amyloid precursor protein (APP; Goate et al., 1991), which becomes more susceptible to cleavage by β and γ secretases when mutated, yielding

the A β peptide. This A β peptide inhibits signal transduction cascades common to the insulin receptor or Wnt pathways, in both cases, resulting in an increase of GSK3 β activity (Busciglio et al., 1995; Ferreira et al., 1997; Takashima et al., 1998; Townsend et al., 2007; Magdesian et al., 2008). The other two genes susceptible to mutation are those encoding presenilin 1 and presenilin 2 (PS-1 and PS-2), the mutation of which may also increase GSK3 β activity (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995; Duff et al., 1996; Takashima et al., 1996; Price and Sisodia, 1998; Baki et al., 2004; Kimura et al., 2007). Thus, the effects of the presence of mutated APP, PS-1, or PS-2 on neurons converge at the activation of GSK3 β . Hence, our present working hypothesis is that the mutations in APP, PS-1, or PS-2 that provoke FAD promote GSK3 β activation. This activation of GSK3 β could deregulate certain mechanisms implicated in proliferation, differentiation, migration, and neuronal cell death. Indeed, loss of DISC-1 function was recently shown to produce GSK3 activation and, as a consequence, a failure in cell proliferation and death (Mao et al., 2009). Because it modifies β -catenin activity, GSK3 β is a kinase implicated in insulin-mediated signal transduction and in Wnt signaling (Barth et al., 1997). Interrupting β -catenin signaling reduces neural progenitor proliferation and neurogenesis in AD by promoting the premature exit from the cell cycle and blocking maturation (Adachi et al., 2007; Duan et al., 2007; He and Shen, 2009; Mao et al., 2009).

In this study, we propose the following working model to explain the possible mechanisms affected by GSK3 β overex-

F9 pression (Fig. 9). GSK3 β has two main effects, the first influences cell-cycle exit and premature differentiation, while the second blocks migration/maturation. Both these effects result in apoptosis and cell death. Although these processes occur, Type B cells/astrocytes still divide under the influence of microglia activation and also in response to the need to replenish the neuronal progenitor pool in the SGZ. Continuous astrocyte proliferation leads to the depletion of astrocytes and the neurogenic niche (Battista et al., 2006; Choi et al., 2008a,b). This cell death together with impaired neurogenesis produces a decrease in the volume of the DG, possibly recapitulating the events that occur in AD in humans. Thus, a potential therapy to redress these processes in AD pathology could involve the use of compounds to decrease GSK3 β activity at early stages of the disease. However, at later stages, it may be advisable to use combined therapy by administering GSK3 β antagonists and replacing depleted NPCs. Curiously, neuronal stem-cell transplantation improved memory, in a recent study, where neuronal precursor depletion was induced (Yamasaki et al., 2007).

Acknowledgments

The confocal microscopy was carried out by the Confocal Microscopy Service at the Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, Spain). We thank M. Soriano for his expert technical assistance with the EM. We also thank I. Borreda, M.L. Lop, P. Carrión, and E. Langa for their skilful technical support, M. Rabena for her kind help in the statistical analysis of the foci, Dr. C. Avendaño for his inestimable help with stereological analysis, and Dr. Ulises Gomez Pinedo for assistance with the immunochemistry.

REFERENCES

- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K. 2007. β -Catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25:2827–2836.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9:723–727.
- Amaral DG, Dent JA. 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51–86.
- Avila J. 2006. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 580:2922–2927.
- Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK. 2004. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: Effects of FAD mutations. *EMBO J* 23:2586–2596.
- Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. 1997. Cadherins, catenins and APC protein: Interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:683–690.
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: Transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23:83–93.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. 1995. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879–888.
- Choi SH, Veeraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. 2008a. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron* 59:568–80.
- Choi YS, Cho HY, Hoyt KR, Naegle JR, Obrietan K. 2008b. IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia* 56:791–800.
- Chuang TT. Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* (in press).
- Danscher G, Fjeringstad EJ, Fjeringstad E, Fredens K. 1976. Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead and copper). *Brain Res* 112:442–446.
- de Barreda EG, Perez M, Ramos PG, de Cristobal J, Martin-Maestro P, Moran A, Dawson HN, Vitek MP, Lucas JJ, Hernandez F, Avila J. 2010. Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 37:622–629.
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Saez K, Henriquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT. 2007. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9434–9439.
- Doetsch F, Hen R. 2005. Young and excitable: The function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15:121–128.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H. 2007. Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130:1146–1158.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. 1996. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710–713.
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8233–8238.
- Engel T, Goni-Oliver P, Gomez-Ramos P, Moran MA, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F. 2008. Hippocampal neuronal subpopulations are differentially affected in double transgenic mice overexpressing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 τ and glycogen synthase kinase-3 β . *Neuroscience* 157:772–780.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F. 2006. Coexpression of FTDP-17 τ and GSK-3 β in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27:1258–1268.
- Ferreira A, Lu Q, Orecchio L, Kosik KS. 1997. Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A β . *Mol Cell Neurosci* 9:220–234.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M and Hardy J. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704–706.
- He P, Shen Y. 2009. Interruption of β -catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:6545–6557.
- Hernandez F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. 2002. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529–1533.

- Ibrahim MZ, Khreis Y, Koshayan DS. 1974. The histochemical identification of microglia. *J Neurol Sci* 22:211–233.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4710–4715.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:343–347.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206–3212.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52:135–143.
- Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A. 2007. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 26:5143–5152.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
- Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads. *Exp Neurol* (in press).
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu Y-H, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977.
- Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2008. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:78–84.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. 2001. Decreased nuclear β -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J* 20:27–39.
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST. 2008. Amyloid- β binds to the extracellular cysteine-rich domain of frizzled and inhibits Wnt/ β -catenin signaling. *J Biol Chem* 283:9359–9368.
- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH. 2009. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β / β -catenin signaling. *Cell* 136:1017–1031.
- Price DL, Sisodia SS. 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21:479–505.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, George-Hyslop ST. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775–778.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. 2000a. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61:133–168.
- Sanchez C, Perez M, Avila J. 2000b. GSK3 β -mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur J Cell Biol* 79:252–260.
- Schaffer BA, Bertram L, Miller BL, Mullin K, Weintraub S, Johnson N, Bigio EH, Mesulam M, Wiedau-Pazos M, Jackson GR, Cummings JL, Cantor RM, Levey AI, Tanzi RE, Geschwind DH. 2008. Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 65:1368–1374.
- Seki T, Arai Y. 1995. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479–2482.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359–378.
- Shafit-Zagardo B, Kalcheva N. 1998. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol Neurobiol* 16:149–162.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM and George-Hyslop ST. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K. 1996. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid β peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Neurosci Lett* 203:33–36.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9637–9641.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. 2007. Soluble A β inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305–33312.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. 1997. Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17:7850–7859.
- Yamasaki TR, Blurton-Jones M, Morrisette DA, Kitazawa M, Oddo S, LaFerla FM. 2007. Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss. *J Neurosci* 27:11925–11933.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3–11.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–660.

Journal Section: Neurobiology of Disease

Title: Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral areas of the hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β .

Abbreviated title: neurodegeneration of dorsal and ventral DG

Authors and author addresses:

Almudena Fuster-Matanzo¹, María Llorens-Martín¹, Elena Gómez de Barreda¹, Jesús Ávila^{1,2} and Félix Hernández^{1,2}

¹Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. ²Centro de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

Address correspondence to: Félix Hernández, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; Tel.: +34 91 196 45 63; fax: +34 91 196 44 20; E-mail address: fhernandez@cbm.uam.es

Number figures: 6

Number pages: 18

Number Words: Abstract (257), Introduction (420), Discussion (907)

Authors declare any Conflict of Interest

Acknowledgements: This work was supported by grants from Noscira, Fundación Botín, the Spanish CICYT, the Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), the CIBER on Neurodegeneration and by institutional grants from the Fundación Ramón Areces.

ABSTRACT

Dorsal hippocampal regions are involved in memory and learning processes, while ventral areas are related to emotional and anxiety processes. Hippocampal dependent memory and behaviour alterations do not always come out in neurodegenerative diseases at the same time. In this study we have tested the hypothesis that dorsal and ventral dentate gyrus (DG) regions respond in a different manner to increased glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) levels in GSK3 β transgenic mice, a genetic model of neurodegeneration. Reactive astrogliosis indicate tissue stress in dorsal DG, while ventral area does not show that marker. These changes occurred with a significant reduction in dorsal granular cell layer volume and total cell number. These data correlate with a significantly higher level of cell death in dorsal area than in ventral one as measured by fraction-positive cells. Biochemistry analysis showed higher levels of phosphorylated GSK3 β in those residues that inactivate the enzyme in hippocampal ventral areas compared with dorsal area suggesting that the observed susceptibility is in part due to different GSK3 regulation. Previous studies carried out with this animal model had demonstrated impairment in Morris Water Maze and Object recognition tests point out to dorsal hippocampal atrophy. Here, we show that two tests used to evaluate emotional status, the light–dark box and the novelty suppressed feeding test, suggest that GSK3 β mice do not show any anxiety-related disorder. Thus, our results demonstrate that *in vivo* overexpression of GSK3 β results in dorsal but not ventral hippocampal DG neurodegeneration and suggest that both areas do not behave in a similar manner in neurodegenerative processes.

INTRODUCTION

GSK3 is a kinase present in most tissues and is particularly abundant in the brain (Woodgett, 1990). There are two isoforms of the enzyme termed GSK3 α and GSK3 β (Woodgett, 1990). GSK3 is known to participate in multiple signaling pathways coupled to receptors for a variety of signaling molecules such as insulin or wnt among many others (Jope and Johnson, 2004). Aberrantly increased GSK3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of chronic metabolic disorders like type-II diabetes (Eldar-Finkelman, 2002), as well as of CNS conditions such as bipolar mood disorder (Klein and Melton, 1996), schizophrenia (Kozlovsky et al., 2002), diseases like Huntington's disease (Carmichael et al., 2002), frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (Engel et al., 2006c) and Alzheimer disease (Avila et al., 2004). With regard to GSK3 and neurodegeneration, increased GSK3 activity has been reported to result in neuronal apoptosis and GSK3 inhibitors have been shown to exert antiapoptotic and neuroprotective effects in many different cell and mouse models (Beurel and Jope, 2006; Hetman et al., 2000; Pap and Cooper, 1998). Accordingly, potent and specific GSK3 inhibitors are currently under development (Cohen and Goedert, 2004; Engel et al., 2006a; Medina and Avila, 2010).

Recent evidences have established that there are differences among dorsal and ventral hippocampal areas, at least in rodent (Fanselow and Dong, 2010). All these differences are associated with functional specialization, as studies with lesions in dorsal or ventral hippocampus demonstrate (Barkus et al., 2010). Thus, dorsal regions are involved mainly in memory and learning processes, while ventral areas are related with anxiety, affective or emotional processes (Snyder et al., 2009). That regionalized processes correlate at genetic and cellular levels, showing that DG is not uniform and

that there exist a regionalized specialization (Fanselow and Dong, 2010). These studies can be likely translated to human. Thus, the dorsal hippocampus corresponds to the posterior hippocampus in primates, while the ventral correspond to the anterior hippocampus in primates.

Here, we have first analyzed GSK3 β levels in both DG areas in wild-type mice and explored the effect of GSK3 β overexpression in both dorsal DG (dDG) and ventral DG (vDG) in a mouse model with increased GSK3 β levels (Lucas et al., 2001). This animal model exhibits a memory deficit (Engel et al., 2006b; Hernandez et al., 2002) and impaired synaptic plasticity (Hooper et al., 2007). We demonstrate that ventral hippocampus withstands a neurodegenerative signal as an increase in GSK3 β levels better than dorsal hippocampus. In good agreement, evaluation of anxiety-related tests shows a normal behaviour.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue processing

Animal care. GSK3 β mice were generated as described previously (Lucas et al., 2001). Briefly, GSK3 β mice were bred by crossing TetO mice (carrying the bi-directional tet-responsive promoter followed by the GSK3 β and β -galactosidase cDNAs, one in each direction) with CamKII α -tTA mice. The dual transgenic mice were designated GSK3 β , and they overexpress GSK3 β in the cortex and hippocampus. Transgenic mice as well as wt mice (C57BL/6) were bred at the *Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”* (Madrid, Spain) and the mice were kept on a normal light-dark cycle (12 hours light/12 hours dark), with free access to food and water.

Tissue processing. Animals were killed and the brain was removed, post-fixed overnight in 4% PFA and 30 μ m sagittal sections were obtained on a cryostat.

Volumetric measurement of dentate gyrus atrophy

For volumetric measurement, thionine stained section areas of dentate gyrus were delineated and measured by means of Methamorph image-analysis system. The total volume (mm³) of each dentate gyrus was achieved by integration of areas (mm²) with the distance between each sagittal plane (mm). The points for integration were 0.36 mm (Fig 104 of the atlas of Paxinos and Franklin (Paxinos, 2001)) and 3.00mm (Fig 126 of the same atlas) with respect to the midline. In those sections where dentate gyrus is not divided in two areas, dorsal and ventral areas were measured taking into account the middle point. Statistical analysis was determined by a T-test.

Western blot analysis

Brains were quickly dissected on an ice-cold plate. Hippocampus was isolated and horizontally cut in two equal halves, the dorsal and the ventral hippocampus. Extracts for Western blot analysis were prepared by homogenizing the dorsal and ventral hippocampus from 2 months-old wildtype and transgenic animals in ice-cold extraction buffer consisting of 50mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM EDTA, a protease inhibitor cocktail (Roche) and 1 μ M Okadaic acid (phosphatase inhibitor). The samples were homogenized and protein content was determined by Bradford. Thirty micrograms of total protein were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH). The experiments were performed using the following primary monoclonal antibodies: anti-GSK3 β (1/1000) (BD Transduction

Laboratories), anti-p21/9- GSK3 α/β (1/500) (Cell Signalling), anti-Akt (1/1000) and anti-phospho-Akt (Ser473) (1/1000) (both from Cell Signalling) and anti- β -tubulin (1/5000) (Sigma). The filters were incubated with the antibody at 4°C overnight in 5% nonfat dried milk. Secondary goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1/1000; Invitrogen, San Diego, CA) and ECL detection reagents (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) were used for immunodetection. Quantification was performed by densitometric scanning. The densitometry values were obtained in the linear range of detection with these antibodies. These values were normalized with respect to the values obtained with an anti- β -tubulin antibody to correct for total protein content.

Immunostaining

For GFAP immunohistochemistry , sections were rinsed in PBS and incubated in blocking solution (PBS/BSA/FBS/Tx-100) followed by an overnight incubation at 4° with the primary antibody: rabbit anti-GFAP (1/500) (Promega). Then, sections were washed and incubated for 1 hour with the goat anti-rabbit biotinylated antibody (1:400, Vector) and then another hour with an avidin-biotin-peroxidase complex complex (ABC, 1:250, Vector). The antibody staining was finally visualised with diaminobenzidine (DAB, 0.05%, Sigma). Images were taken using an Axioskop 2 plus microscope and a CCD camera (Coolsnap FX color).

For immunofluorescence, immunostaining was carried out following a standard procedure. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a PB solution containing BSA 1% and TritonX-100 1%. The following antibodies were used: mouse anti-Myc, (1/100) (Hibridoma) and rabbit anti-fractin (1/500) (BD Pharmingen). After washing with blocking solution 3 times, sections were incubated with donkey Alexa-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse Alexa-Fluor

488/555/633-conjugated) overnight at 4°C (1:1,000) (Molecular Probes, Millipore). Finally, after washing with PB solution, sections were incubated with DAPI (1/5,000) (Calbiochem) for 10 minutes.

Cell counting

Fractin- and reactive GFAP-⁺ cells were quantified on a series of slices of dorsal and ventral dentate gyrus (DG) from 2 months-old wildtype and transgenic mice using an inverted Axiovert200 Zeiss fluorescence microscope. Astrocytes were considered reactive when they showed hypertrophy and a great number of shorter GFAP⁺ processes. The number of positive cells for each marker was divided among each section's DG volumen in order to obtain a cell density (cells/mm³). The DG area of each section was estimated delineating the border of the granule cell layer on the same sections where cell numbers was estimated, by using DAPI staining and a 5X objective. Data are presented as mean cell density (cells/mm³). All DG areas were measured using Image J software (ImageJ, v. 1.33, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Density of mature granule neurons (Number of cells/mm³) and myc⁺ cells was analyzed through the application of a physical-dissector method developed for confocal microscopy (Zeiss LSM710), as described previously (Llorens-Martin et al., 2006). Briefly, the physical disector was applied to sections stained with DAPI and myc, so all nuclei of mature neurons in the granule cell layer were counted (excluding those nuclei resembling erythrocytes, if any, and the immature cells, easily distinguishable because of its irregular nuclear profiles and highly condensed cromatin). Data are presented as cell density (cells/mm³).

Novelty Suppressed Feeding test

Adult mice (three months) were weighed and food was removed from the cage, although water remained available *ad libitum*. Twenty-four hours later mice were transferred placed in a novel arena with in the center a pre-weighed quantity of food pellets. Each animal was placed in the corner of the testing area and the latency to chew a food pellet (about 2 g) located in the center of the arena, time spent feeding, and total food consumption were recorded over 10 min. All the experiments were performed between 13:00 and 18:00 h.

Light/Dark Choice Test

Exploration of the light/dark chamber was measured using the equipment from Med Associates Inc. The mouse is placed for 15 min in a box made of two compartments, one white and lit and the other dark. Two parameters were recorded, the percent of time spent in the dark compartment and the number of transitions between compartments (crossings).

Statistical analysis

Data were analyzed using two-way ANOVA in dorsal and ventral comparisons between wildtype and transgenic mice. To compare GSK-3 levels and its phosphorylated status in wildtype and Tet/GSK-3 β mice separately, we perform a t-test. All the analyses were performed using SPSS for Windows version 17.0.

RESULTS

GSK3 β levels in ventral and dorsal DG

To examine whether there exist dorso-ventral differences in GSK3 β levels in wild-type mice, western blot analysis of dorsal hippocampus and ventral hippocampus

homogenates were performed using antibodies that recognize inactive GSK-3 (phosphorylated at serine 9) and with an antibody that recognize GSK3 β regardless of its phosphorylation state. Western blot determination of the phosphorylated form of GSK3 β revealed an increase in the ratio phosphorylated/unphosphorylated forms in ventral area compared with dorsal area in wild-type mice (Figure 1). The main kinase able to phosphorylate inhibitory GSK3 domains is AKT, thus we analyzed by western blot the hippocampal levels of the active form of AKT that results from phosphorylation on Ser473. Interestingly, and in good agreement with GSK3 findings, AKT is more active ventrally than dorsally. This strongly suggests that some regional differences exist in the DG with a reduced ventral GSK3 β activity compared with dorsal area.

Transgenic GSK3 β is overexpressed in ventral and dorsal DG

The tTA transgene is under the control of the calcium/calmodulin kinase II α promoter allowing expression of transgenes in forebrain neurons. To gain insight into which dentate gyrus area is overexpressing transgenic GSK3 β , we performed immunofluorescence with anti-myc antibody (transgenic GSK3 β has a myc epitope at its N-terminal end). Immunofluorescence analysis of sagittal brain sections from GSK3 β mice revealed intense staining of the MYC-GSK3 β transgene with the anti-myc antibody in granular neurons from dDG and vDG with a similar number of cells (Fig. 2A-B). Western-blot analysis was used to confirm that both hippocampal areas show similar transgenic GSK3 β levels. Probing protein extracts with anti-GSK3 antibody demonstrated similar levels of transgenic GSK3 β (with a slight higher molecular weight due to myc epitope) in both hippocampal areas (Fig. 2C-D). From these experiments we therefore conclude that transgenic GSK3 β levels are similar in dDG and vDG. Then, we analyzed Ser9 phosphorylation of total GSK3 β . Fig. 2E shows, as previously observed

in wild-type mice, an increase (although no statistically significant) in the levels of inactive GSK-3 in ventral area.

Neurodegeneration is observed in dorsal DG, but not in ventral DG.

We have reported that GSK3 β mice present a severe atrophy of total DG, suggesting an important neurodegeneration (Engel et al., 2006c). To characterize this neurodegeneration, we have previously analyzed thionine-staining in brain sections from two year-old GSK3 β mice. Those studies showed a clear reduction in the size of the DG in GSK3 β mice when compared to the wt mice. However, we used the entire DG for quantification analysis and a regional study was not performed. When we carried out that kind of analysis a substantial decrease in the dDG of the hippocampus of GSK3 β mice was observed. A volumetric analysis of thionine-stained brain sections (Figure 3A-C) revealed that, as compared to wt mice, 2-year-old GSK3 β mice exhibited an $40.4 \pm 7.06\%$ ($P < 0.05$, $n=3$) decrease in dDG volume while vDG was almost unchanged (a decrease of $1.02 \pm 2.96\%$; $P < 0.6$, $n=3$). These data indicate that the neurodegeneration observed in GSK3 β mice is mainly due to dorsal area.

In view of this previous finding, we decided to test whether dDG atrophy was due to granular neurons loss through the application of a physical-dissector method in 2-months-old GSK3 β mice. As can be seen in Fig. 3D a significant decrease ($19.5 \pm 0.4\%$, $p < 0.001$, $n=6$) in the number of granular neurons was found in 2-months-old GSK3 β dDG with respect to their control littermates. We did not find that decrease in vDG.

Apoptosis is observed in dorsal DG, but not in ventral DG

Since overexpression of GSK3 β results in apoptotic neuronal death as shown in the initial characterization of GSK3 β mice (Lucas et al., 2001), we wondered whether expression of GSK-3 β in DG of GSK-3 β mice might also result in regional hippocampal apoptosis. To explore in a quantitative manner the incidence of neuronal apoptosis of GSK3 β mice, we performed fractin staining (fractin is an actin fragment cleaved by caspase labeling dying cells). In good agreement with previous findings, GSK-3 mice showed an increase in the number of fractin⁺-positive cells in the dDG (an increase of 168 \pm 30%. $P < 0.001$, $n = 9$, Fig. 4), while no a significant difference in the number of fractin⁺-positive cells was detected in the vDG.

Reactive astrogliosis often accompanies neuronal loss and serves as a hallmark lesion for neurodegeneration. Thus, we next tested whether the neuronal alterations triggered by overexpression of GSK3 β were accompanied by reactive astrocytosis (Figure 5). A remarkable increase in astrogliosis was quite evident in hippocampal dDG (an increase of 177.8 \pm 10.5% compared with wild-type mice , $p < 0.001$, $n = 11$) as shown by immunohistochemistry performed with an antibody raised against GFAP, but not in vDG of GSK3 β mice. Together, these results indicate that the neurodegeneration occurs in mice overexpressing GSK3 β mainly in hippocampal dDG.

Behavioral consequences of GSK3 β overexpression

We have previously demonstrated that an increase in GSK3 activity in the hippocampus is enough to elicit a deficit in spatial learning in the Morris water maze in three-month old animals (Hernandez et al., 2002). Learning deficits in GSK3 β mice were also evidenced in the object recognition test (Engel et al., 2006b). These data confirm that hippocampal functions related with dorsal hippocampus are altered in GSK3 β mice. To evaluate whether GSK3 β overexpression also alter functions related

with ventral areas, mice were tested on two tests of anxiety-like behavior: light/dark box and novelty suppressed feeding test (Figure 6). In the light/dark test, GSK3 β mice did not show differences respect to wild-type mice in total crossings (T-test, $t = 1,395$; $p = 0.193$) or in the amount of time spent in the dark compartment (T-test, $t = -0.795$; $p = 0.445$). Similar findings were observed in the novelty suppressed feeding test (Figure6). Thus, latency to feed in the home cage and amount of food consumed were not different between both groups which suggest again no alterations in motivational factors. Interestingly, no differences in the weight loss during food restriction among transgenic and wild-type mice were detected. These data, with the previously described no differences in the open field test, in terms of total horizontal and vertical activities, time spent in movement, time spent in centre vs. periphery, or stereotypic movements (Hernandez et al., 2002) demonstrate that GSK3 β mice do not have altered anxiety-like behavior.

Discussion

The main finding of the current study was to demonstrate that dorsal dentate gyrus is more susceptible to degeneration than ventral area in response to an increase in GSK3 β levels, regarding the pattern of transgene expression driven by the CamKII α promoter, with similar expression in all the hippocampal DG neurons. That conclusion is supported by the following observations: (i) a reduction in the number of granular neurons is observed in dDG of GSK3 β mice compared with ventral area; (ii) neuronal death is increased in dDG of GSK3 β mice; (iii) overexpression of GSK3 β in both DG areas was accompanied by reactive astrogliosis only in the dorsal area; iv) in good agreement, anxiety-like behavior (measured in light/dark box and novelty suppressed

feeding tests) is not altered indicating that behavior alterations related with ventral area were not found although a cognitive deficit, related with dorsal areas, is present.

Deregulation of GSK3 has been linked to several prevalent neuropathological conditions. These include bipolar mood disorder (Klein and Melton, 1996), schizophrenia (Kozlovsky et al., 2002), diseases like Huntington's disease (Carmichael et al., 2002), frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (Engel et al., 2006c) and Alzheimer disease (Avila et al., 2004). Therefore, the data reported here on regional consequences of increased GSK3 levels in the DG may have implications in many disease conditions.

Our results show that increased GSK3 levels induces a severe pathology in the hippocampus thus strengthening the hypothesis that GSK-3 dysregulation may contribute to neurodegeneration. However, important differences seem to exist among neurons. More precisely, some neurons induce an apoptotic program while others seem to survive. Thus, dDG granular neurons undergo apoptotic death (measured as an increase in the number of fractin+ cells), while vDG neurons do not suffer that processes and survive. The results reported here are indicative of the effects of increased GSK-3 level and, to some extent, they may have implications when considering the potential side effects and the potential therapeutic efficacy of chronic administration of potent and selective GSK-3 inhibitors that are currently under development for treatment of chronic conditions such as Alzheimer's disease and mood disorders (Cohen and Goedert, 2004; Medina and Avila, 2010).

These finding raise the question of how GSK3 β overexpression causes dDG degeneration while ventral area seems to be protected. Both regions differ not only in gene expression but also in neuronal connectivity (Fanselow and Dong, 2010). Taking into account that GSK3 β is an enzyme with wide effects on neuronal metabolism,

including gene expression (Johe and Johnson, 2004) neuronal cytoskeleton, plasticity, intracellular transport and neuronal survival, (Grimes and Johe, 2001) our study suggest that transduction pathways modulating GSK3 are different in both areas.

It is well established that GSK3 β activity is inactivated by phosphorylation at Ser9, mainly via AKT, and inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors (Johe and Johnson, 2004). We found that GSK3 β protein levels were similar in both areas. However, the phosphorylation of AKT at Ser473, which represents its activation, increased in ventral areas. In good correlation, Ser9 phosphorylation of GSK-3 β was found to be high also in ventral areas. Considering the levels of active AKT and inactive GSK3 β , it can be suggested that ventral hippocampus withstands an increase of GSK3 better than dorsal hippocampus. However, further studies are required to specify the mechanisms responsible for those differences as well as the factors making the dDG particularly sensitive to GSK3 β mediated apoptosis.

Taking into account our results it is tempting to speculate that some differences may exist among posterior and anterior human DG (which correspond to dorsal and ventral DG in mice) in relation with GSK3. Aberrantly increased GSK3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of mood disorders (Johe and Johnson, 2004) and in neurodegenerative processes as AD (Avila et al., 2004). Focusing in AD, GSK3 has been proposed as the main kinase able to phosphorylate tau aberrantly (Lovestone et al., 1996; MunozMontano et al., 1997; Pei et al., 1999). Hyperphosphorylated tau does not appear in human dentate gyrus until late stages of Alzheimer's disease (Ohm, 2007). However, mini mental tests demonstrate that cognitive and memory deficits occur in early stages showing that hippocampus is actually altered. Besides, loss of layer II entorhinal neurons occurs in early AD stages (Gomez-Isla et al., 1996) suggesting that all these deep changes in the entorhinal input

has to have a big impact on it. In fact, although no plaques, tangles or neuronal death appear at early AD stages it has been proposed a partial “disconnection” of the human dentate gyrus in AD (Ohm, 2007). Although actually it is merely speculative to propose that posterior hippocampal human regions are involved in memory and learning processes, while anterior areas are related with emotional and anxiety processes, as it occurs in mouse, functional differences of the anterior versus posterior hippocampus have been reported (Pruessner et al., 2001; Strange et al., 1999).

In summary, our results demonstrate that dorsal and ventral dentate gyrus do not conduct in a similar way in an animal model overexpressing GSK3 β . Thus, the dorsal area is more vulnerable than the ventral one. These results may help to understand partly why in some neurodegenerative process the cognitive and behavior alterations do not come out at the same time. From a more general perspective, our study also suggests that the DG should not be studied as a homogeneous region and studies focused in neurodegeneration should study dorsal and ventral areas.

Legend to the figures

Figure1. Western blots analysis of GSK3 and AKT proteins in dDG and vDG from wild-type mice. (A) Western blot detection of GSK3 β , phosphorylated GSK-3 (pSer9-GSK3 β), AKT and phosphorylated AKT isoform (pSer473-AKT) in homogenates from dorsal and ventral hippocampus of wild-type mice. Hippocampal extracts were prepared from animals aged 2 months.. (B) Histograms show the levels of total phosphorylated GSK3 β /total GSK3 β or phosphorylated AKT/total AKT. *P < 0.05.

Figure 2. Pattern of transgene expression in GSK3 β mice. (A) Immunofluorescence in dDG and vDG hippocampal sections of GSK3 β mice performed with an antibody against MYC epitope. Arrows shown MYC-positive cells. (B) Histogram showing the number of MYC positive cells in dDG and vDG of GSK3 β mice. Data are presented as the mean \pm SD number of immunopositive cells per mm² in hippocampal sections. (C) Western blot analysis with an antibody against GSK3 β that recognizes the endogenous

as well as the Myc-tagged transgenic GSK3 in 10-week-old GSK-3 β mice. Arrow shows transgenic protein. (D) Histogram showing the level of transgenic GSK3 β detected by Western blot. (E) Histogram showing the level of total pSer9-GSK3 β in transgenic GSK3 β mice detected by Western blot. Histogram shows the levels of total phosphorylated GSK3 β /total GSK3 β .

Figure 3. Volume and total cell number in dDG and vDG of the hippocampus in old GSK3 β mice. Representative sagittal sections from 18-month-old wild-type (A) and GSK3 β mice (B) thionine stained samples used to measured volumetric quantifications. (C) Volumetric quantification of the atrophy was determined as described in Material and Methods. * $P < 0.05$ versus wt animals. (D) Total neurons in 2-months old wt and GSK3 β mice in dDG and vDG. * $P < 0.05$ versus wt animals .

Figure 4. Neural death in GSK3 mice. (A) dDG representative image of fractin positive cells (green) from GSK3 β mice. DAPI staining in red. (B) Quantification of the number of fractin positive neurons in dDG and vDG from wt and GSK3 β mice. A higher number of fractin positive cells were found in dDG from GSK3 β mice compared to wild-type mice. * $P < 0.05$ versus wt animals

Figure 5. Reactive astrogliosis in dDG compared to vDG in wild-type and GSK3 β mice. Immunohistochemistry in hippocampal sections of wild-type (wt) and GSK3 β mice performed with an antibodies against GFAP. Quantification of the number of reactive astrocytes in 2-months-old wild-type (wt) or GSK3 β mice. * $P < 0.01$ versus wt animals.

Figure 6. Tests of anxiety-like behavior. Histograms showing the performance of 10-week-old wild-type (wt, white bars) or GSK3 β mice (black bars) in the novelty suppressed feeding test and the white-black box. (A-B) Light/dark box: (A) Percent of time spent in the dark compartment (B) Number of transitions between the two compartments made by wt and GSK3 β mice. (C-F) Novelty suppressed feeding test: (C) Wild-type and transgenic mice lost a similar body weight during the 24 h of food restriction. Twenty-four hours after food restriction, mice were transferred to the testing room, placed in a novel arena with in the center a pre-weighed quantity of food pellets. Each subject was placed in the corner of the testing area, and the latency to feed (D), time spent feeding (E), and total food consumption (F) were recorded over 10 min. No significant differences were observed.

REFERENCES

- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., Hernandez, F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-384.
- Barkus, C., McHugh, S. B., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N., Bannerman, D. M., 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626, 49-56.

Beurel, E., Jope, R. S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79, 173-189.

Carmichael, J., Sugars, K. L., Bao, Y. P., Rubinsztein, D. C., 2002. Glycogen synthase kinase-3 β inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277, 33791-33798.

Cohen, P., Goedert, M., 2004. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3, 479-487.

Eldar-Finkelman, H., 2002. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8, 126-132.

Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J. J., Avila, J., Hernandez, F., 2006a. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99, 1445-1455.

Engel, T., Hernandez, F., Avila, J., Lucas, J. J., 2006b. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26, 5083-5090.

Engel, T., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Avila, J., Hernandez, F., 2006c. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 β in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27, 1258-1268.

Fanselow, M. S., Dong, H. W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.

Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., Hyman, B. T., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491-4500.

Grimes, C. A., Jope, R. S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.

Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., Lucas, J. J., 2002. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83, 1529-1533.

Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D., Xia, Z., 2000. Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20, 2567-2574.

Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S. F., Avila, J., Lucas, J. J., Giese, K. P., Stephenson, J., Lovestone, S., 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25, 81-86.

Jope, R. S., Johnson, G. V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29, 95-102.

Klein, P. S., Melton, D. A., 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8455-8459.

Kozlovsky, N., Belmaker, R. H., Agam, G., 2002. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 12, 13-25.

Lovestone, S., Hartley, C. L., Pearce, J., Anderton, B. H., 1996. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 β in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73, 1145-1157.

Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear β -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *Embo J* 20, 27-39.

Llorens-Martin, M., Torres-Aleman, I., Trejo, J. L., 2006. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus* 16, 480-490.

Medina, M., Avila, J., 2010. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16, 2790-2798.

MunozMontano, J. R., Moreno, F. J., Avila, J., DiazNido, J., 1997. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *Febs Lett* 411, 183-188.

Ohm, T. G., 2007. The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163, 723-740.

Pap, M., Cooper, G. M., 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273, 19929-19932.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. The mouse brain. Academic Press.

Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., GrundkeIqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., Cowburn, R. F., 1999. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1010-1019.

Pruessner, J. C., Collins, D. L., Pruessner, M., Evans, A. C., 2001. Age and gender predict volume decline in the anterior and posterior hippocampus in early adulthood. *J Neurosci* 21, 194-200.

Snyder, J. S., Radik, R., Wojtowicz, J. M., Cameron, H. A., 2009. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19, 360-370.

Strange, B. A., Fletcher, P. C., Henson, R. N., Friston, K. J., Dolan, R. J., 1999. Segregating the functions of human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4034-4039.

Woodgett, J. R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9, 2431-2438.

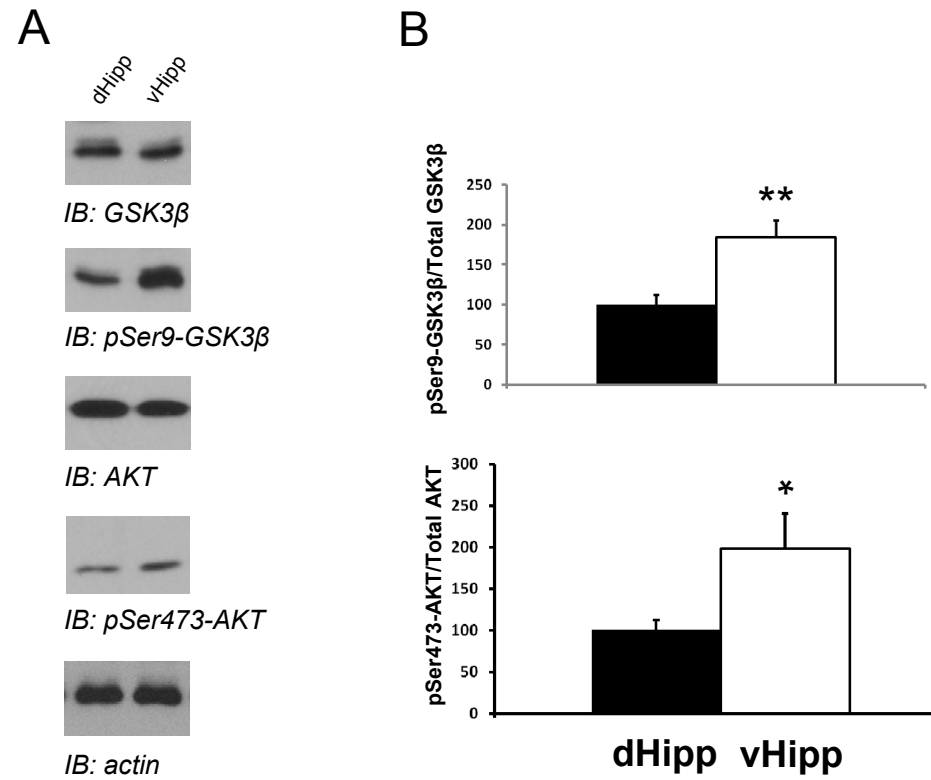


Figure 1. Fuster-Matanzo et al.

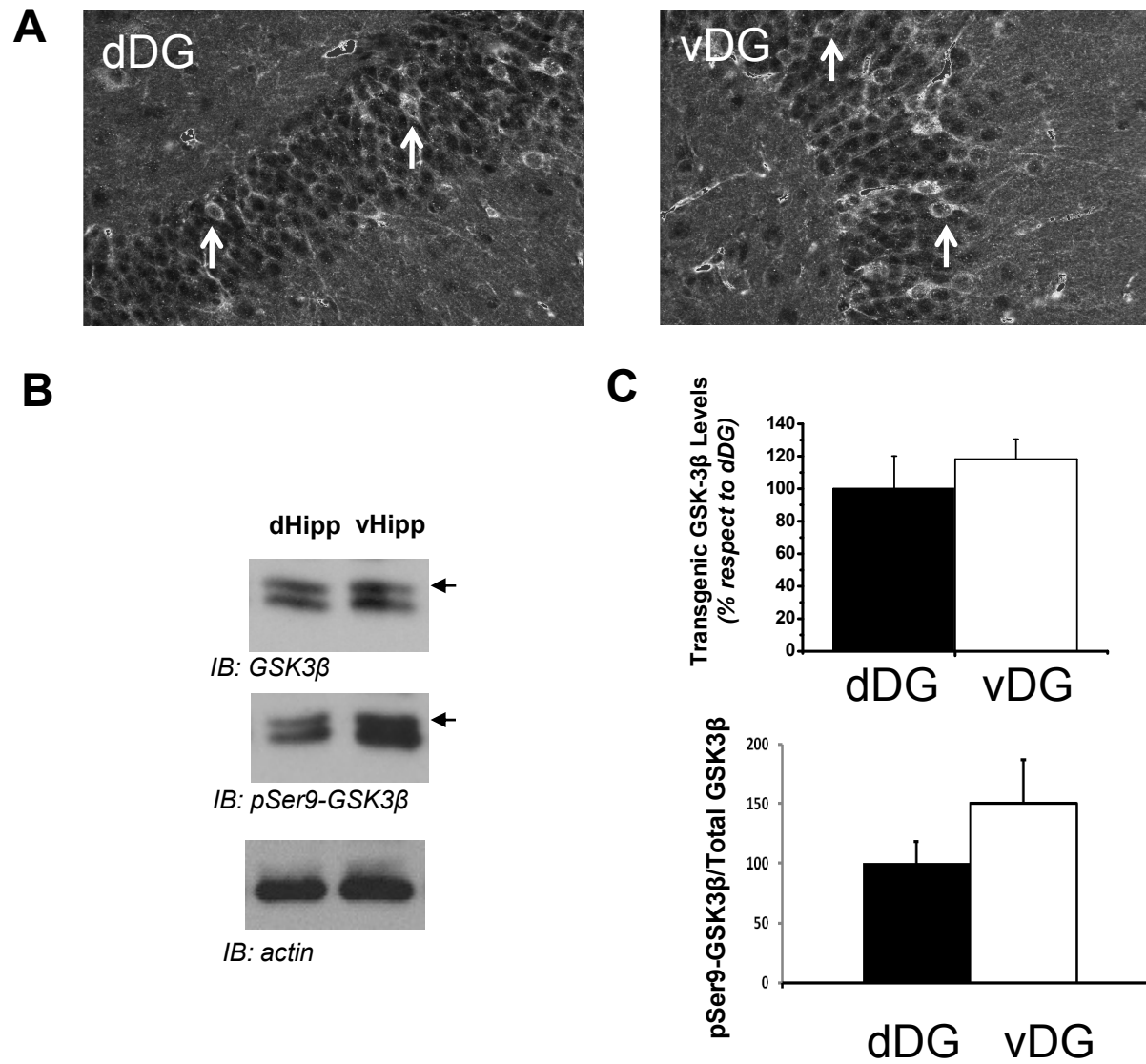


Figure 2. Fuster-Matanzo et al.

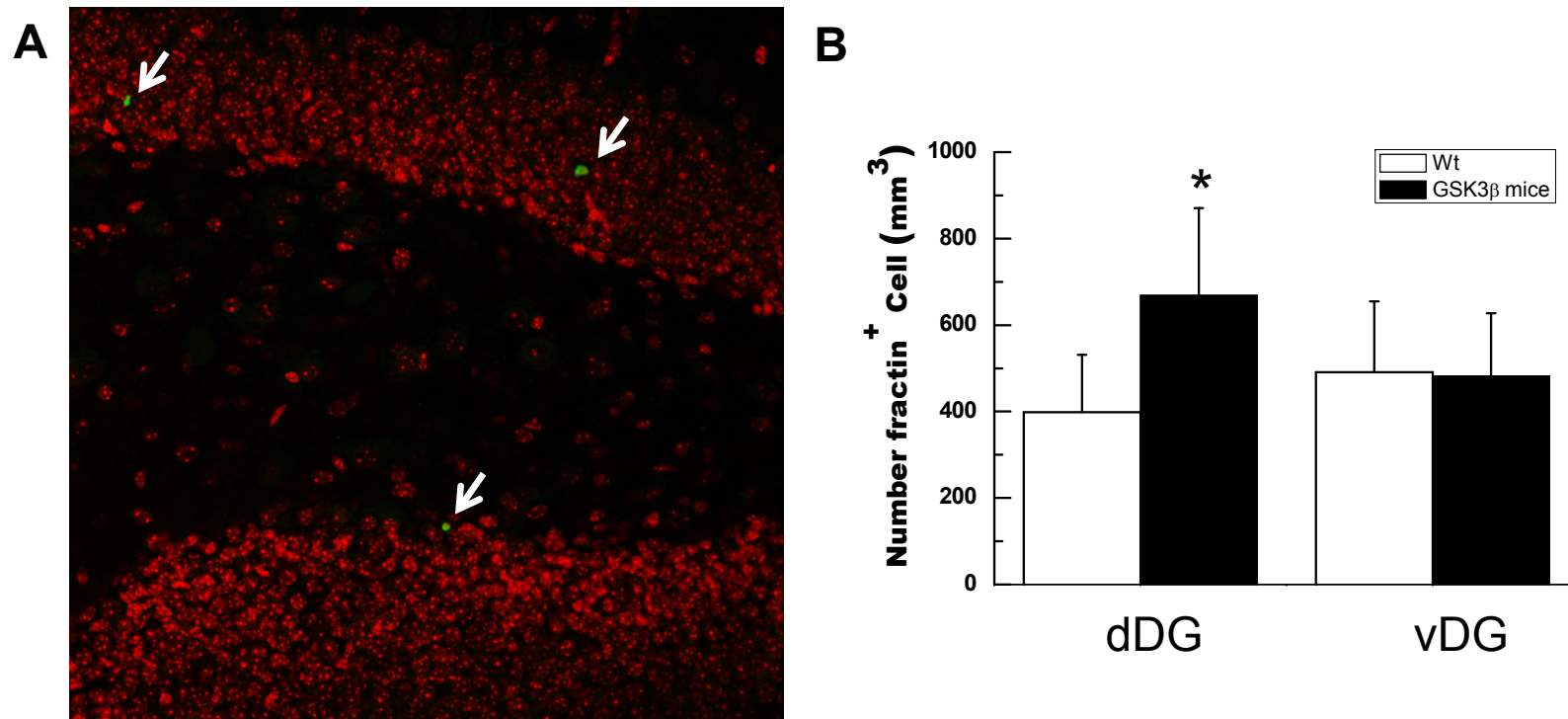


Figure 3. Fuster-Matanzo et al.

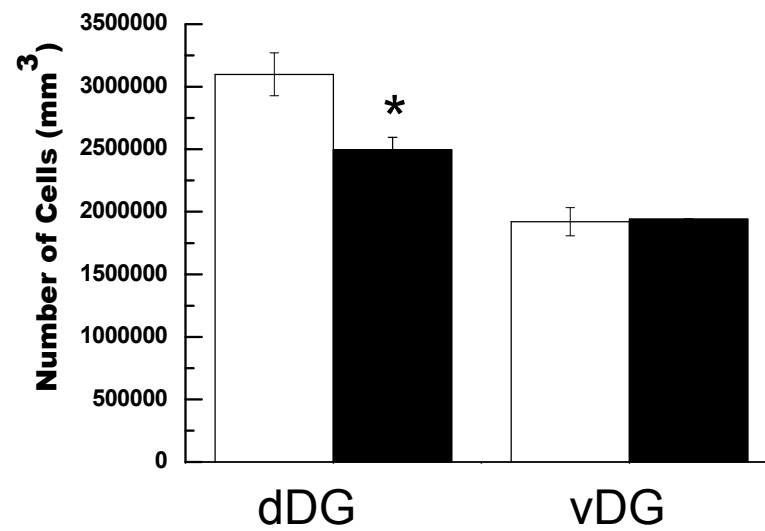


Figure 4. Fuster-Matanzo et al.

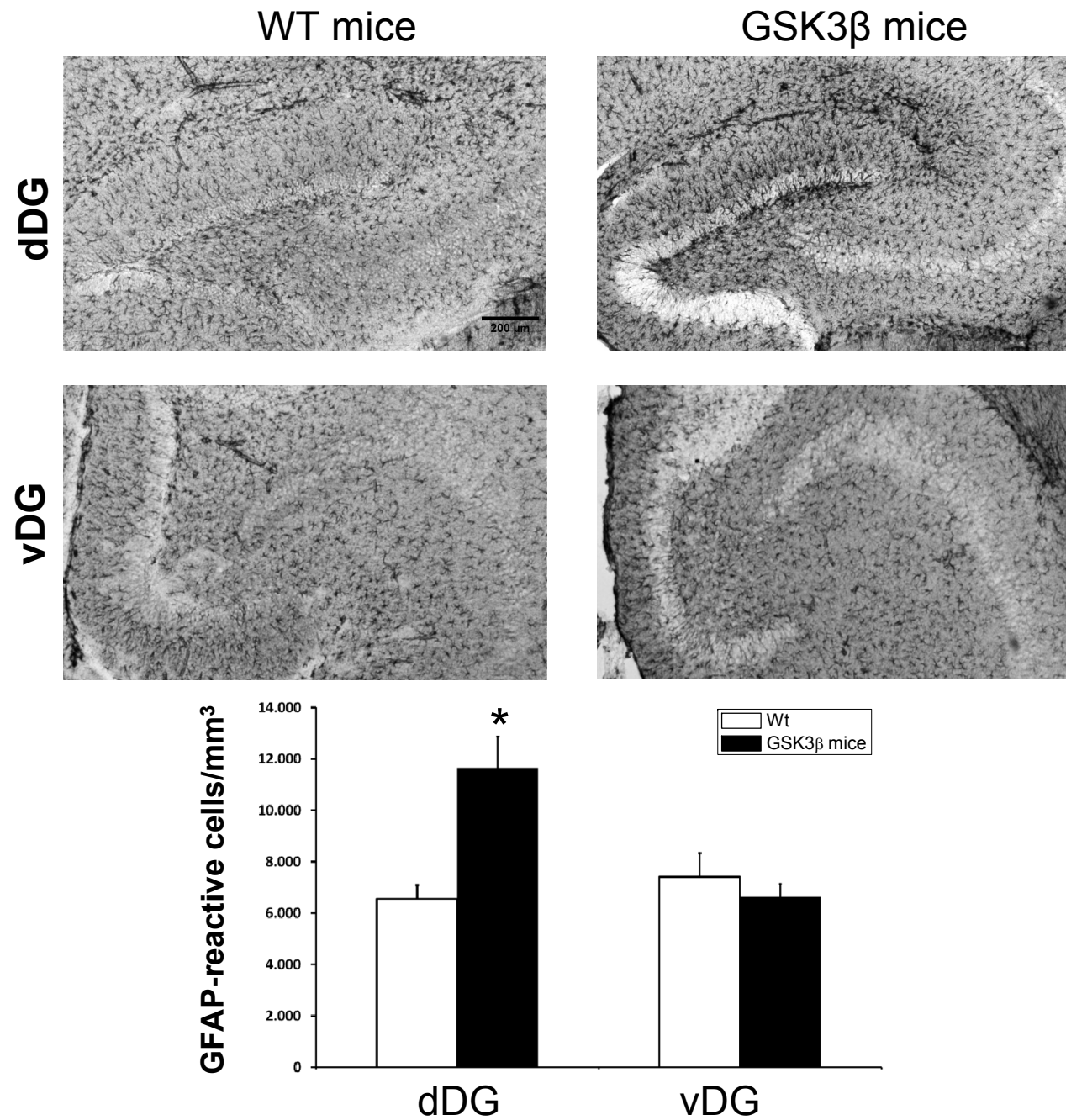
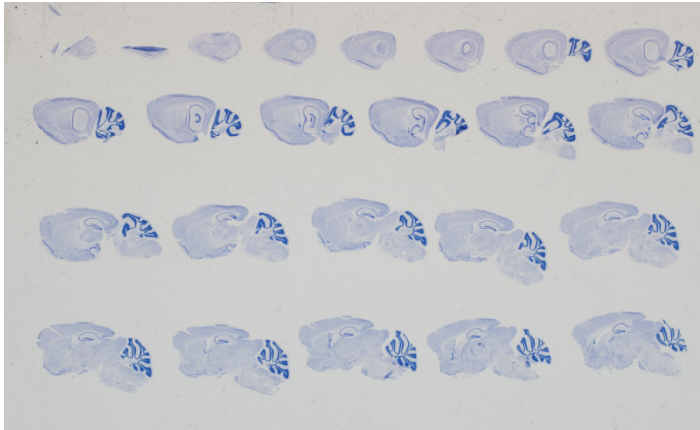
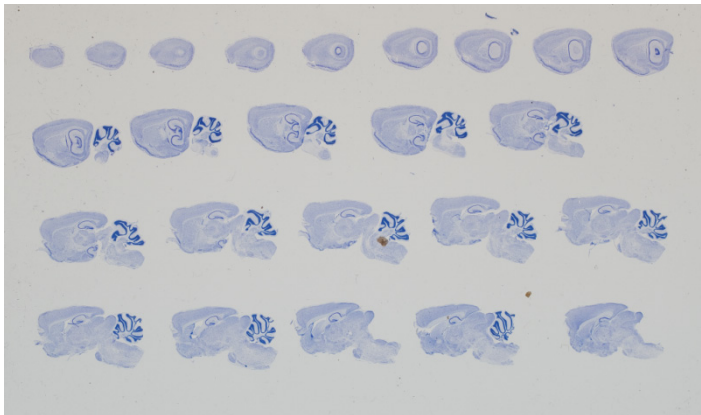


Figure 5. Fuster-Matanzo et al.

A



B



C

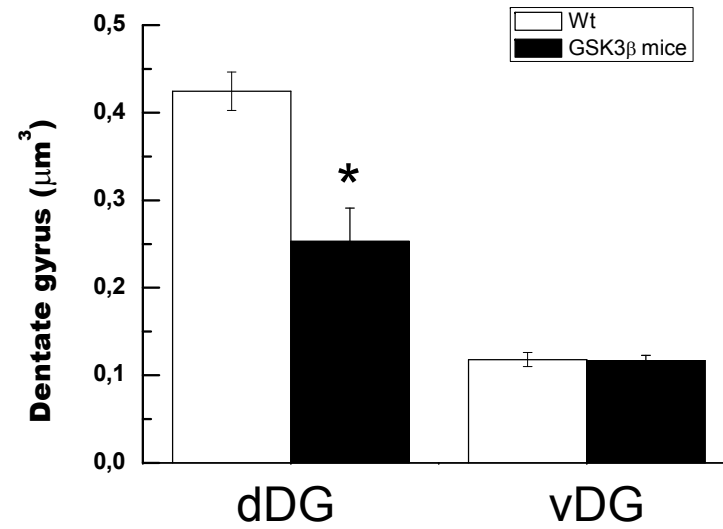


Figure 6. Fuster-Matanzo et al.

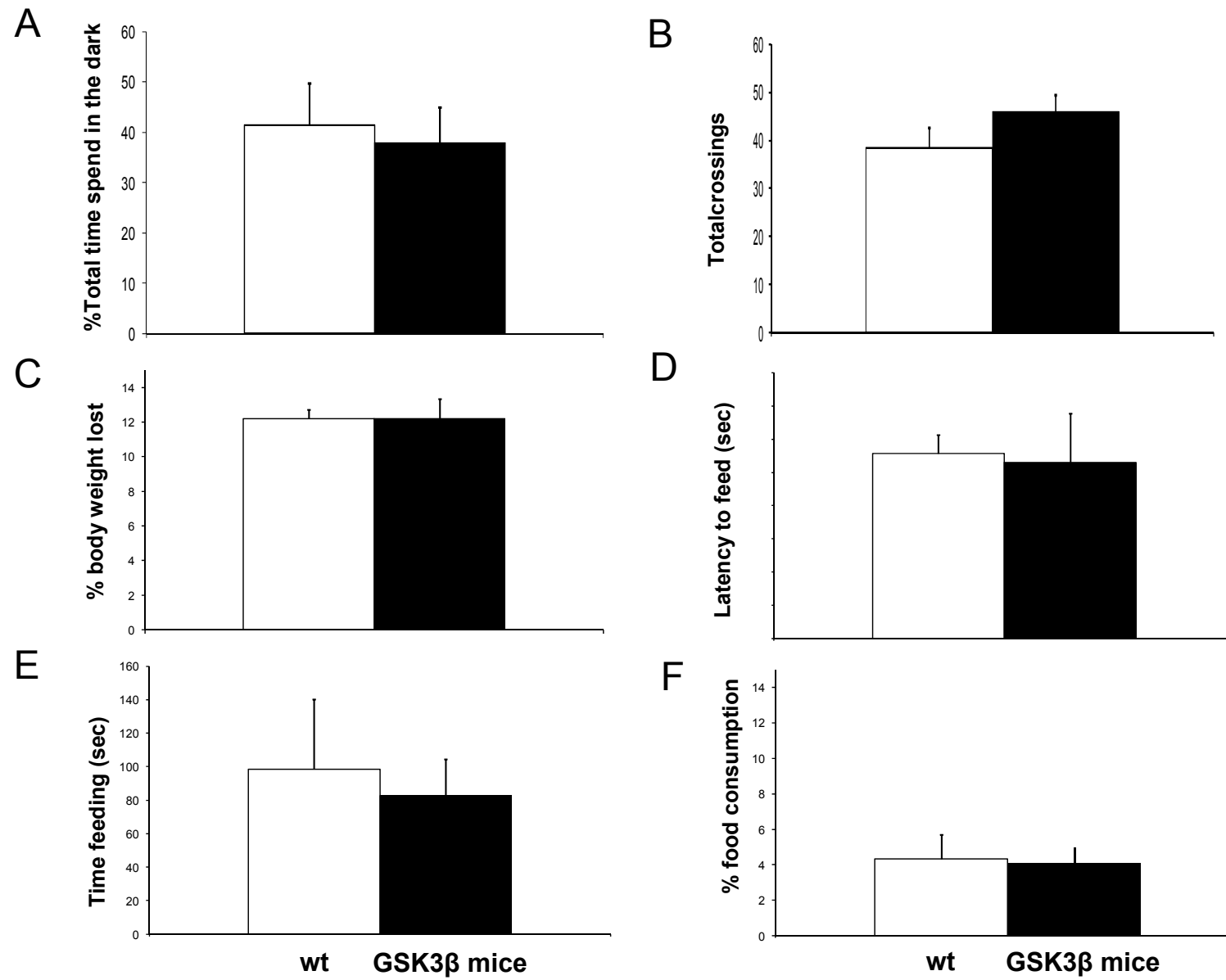


Figure 7. Fuster-Matanzo et al.

